SUSCETIBILIDADE DE CEPAS CLÍNICAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ASSOCIADAS À OTITE EXTERNA CANINA A BACTERIÓFAGOS E CONTROLE DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR UM COQUETEL OTIMIZADO

Luca Aranha Pacheco (IC) e José Luiz Caldas Wolff (Orientador)

Apoio: PIVIC Mackenzie

RESUMO

A otite externa canina causada por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser de difícil tratamento, reforçando a necessidade de estratégias antimicrobianas complementares, como a fagoterapia. Este estudo avaliou uma biblioteca composta por oito bacteriófagos líticos da coleção BrSP (BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP4, BrSP5, BrSP6, BrSP8 e BrSP9) contra 23 cepas clínicas de *P. aeruginosa* associadas à otite externa canina, além de investigar o refinamento de um coquetel destinado ao controle do crescimento bacteriano. Inicialmente, a suscetibilidade das cepas foi determinada pelo teste de microgotas. Nas combinações positivas, a eficiência de plaqueamento (EOP) foi utilizada para confirmar a ocorrência de infecção produtiva e quantificar a produtividade relativa dos fagos. Dezessete das 23 cepas avaliadas (73,9%) foram suscetíveis a pelo menos um bacteriófago. Ensaios com diferentes composições do coquetel demonstraram que BrSP4 e BrSP9 eram dispensáveis para a formulação, permitindo a obtenção de um coquetel refinado com os seis fagos restantes. Em seguida, o coquetel foi avaliado em ensaios de acompanhamento temporal com as 17 cepas suscetíveis, apresentando supressão do crescimento superior a 80% após 12 horas em 12 delas. De modo geral, maior amplitude de hospedeiros e maior produtividade dos fagos estiveram associadas a melhores níveis de controle bacteriano. Os resultados demonstram que a biblioteca BrSP contém fagos ativos contra a maioria das cepas clínicas avaliadas e que o refinamento permitiu obter uma formulação menos complexa e com atividade *in vitro* relevante, fornecendo base para estudos posteriores de validação.

Palavras-chave: Otite externa. *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriófagos.

ABSTRACT

Canine otitis externa caused by *Pseudomonas aeruginosa* can be difficult to treat, reinforcing the need for complementary antimicrobial strategies such as phage therapy. This study evaluated a library of eight lytic bacteriophages from the BrSP collection (BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP4, BrSP5, BrSP6, BrSP8, and BrSP9) against 23 clinical *P. aeruginosa* strains associated with canine otitis externa and investigated the refinement of a cocktail intended to control bacterial growth. Strain susceptibility was initially determined using a spot assay. For positive phage-strain combinations, efficiency of plating (EOP) was used to confirm productive infection and quantify relative phage productivity. Seventeen of the 23 strains (73.9%) were

susceptible to at least one bacteriophage. Assays comparing different cocktail compositions showed that BrSP4 and BrSP9 were dispensable to the formulation, enabling the development of a refined cocktail containing the remaining six phages. The cocktail was subsequently evaluated in time-course assays against the 17 susceptible strains and achieved more than 80% growth suppression after 12 hours in 12 of them. Overall, broader host range and higher phage productivity were associated with improved bacterial control. These findings demonstrate that the BrSP library contains active phages against most of the clinical strains evaluated and that cocktail refinement yielded a less complex formulation with relevant *in vitro* activity, providing a basis for further validation studies.

Keywords: Otitis externa. *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriophages.

1. INTRODUÇÃO

A otite externa canina é a inflamação do epitélio que reveste o conduto auditivo externo. Sua origem é multifatorial: doenças alérgicas, ectoparasitos ou corpos estranhos podem iniciar o processo; características anatômicas e umidade podem favorecer sua instalação; microrganismos proliferam como agentes secundários; e alterações produzidas pela inflamação crônica passam a perpetuar o quadro. A eliminação de uma bactéria, portanto, não resolve isoladamente todas as causas da doença, mas o controle da infecção secundária é indispensável quando ela mantém a inflamação e dificulta a recuperação do conduto (ETTINGER; FELDMAN; CÔTÉ, 2022; BAJWA, 2019).

Entre as bactérias associadas a otites crônicas, recorrentes ou previamente tratadas, *Pseudomonas aeruginosa* representa um desafio particular. A espécie apresenta baixa permeabilidade de membrana, sistemas de efluxo e capacidade de adquirir mecanismos adicionais de resistência. Além disso, pode persistir em biofilmes, comunidades aderidas e envolvidas por matriz extracelular, nas quais gradientes de nutrientes e diferentes estados metabólicos reduzem a resposta de parte da população aos antimicrobianos. Esses fatores ajudam a explicar falhas terapêuticas e recorrências, embora o perfil de resistência deva ser determinado para cada cepa (SECKER; SHAW; ATTERBURY, 2023; TUON et al., 2022).

A fagoterapia propõe uma via antibacteriana diferente. Bacteriófagos líticos reconhecem receptores bacterianos, introduzem seu material genético, produzem novas partículas e lisam o hospedeiro. Como não dependem dos mesmos alvos intracelulares dos antibióticos, a resistência a um fármaco não implica automaticamente resistência ao fago. Essa distinção torna os fagos candidatos relevantes para complementar o controle de *P. aeruginosa*, sem pressupor que substituam o manejo da causa primária da otite ou que todo fago atue sobre qualquer cepa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; EGIDO et al., 2022).

A principal exigência dessa abordagem é a seleção funcional. A atividade de um fago depende da combinação fago-hospedeiro; por isso, um halo no tapete bacteriano é apenas uma etapa inicial. O teste de microgotas permite triagem ampla, a eficiência de plaqueamento verifica se a interação produz novas partículas e o ensaio de acompanhamento temporal em caldo demonstra se o fago ou coquetel reduz o crescimento ao longo do tempo. Em formulações multicomponentes, esse encadeamento também evita manter fagos redundantes ou pouco contributivos apenas para aumentar numericamente o coquetel (MIRZAEI; NILSSON, 2015; FONG et al., 2021; KOVACS et al., 2024a).

O laboratório dispunha de uma biblioteca previamente estabelecida de oito bacteriófagos isolados e titulados - BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP4, BrSP5, BrSP6, BrSP8 e BrSP9 -, mas sua atividade frente a cepas clínicas de otite canina e o desempenho de um

coquetel derivado dessa biblioteca ainda precisavam ser caracterizados. A pergunta de pesquisa foi, portanto, se esses fagos apresentariam infecção produtiva nas cepas clínicas e se seria possível reduzir o número de componentes do coquetel sem comprometer o controle do crescimento bacteriano nas primeiras 12 h de exposição.

Por investigar uma alternativa antibacteriana para infecções de tratamento limitado e produzir conhecimento experimental aplicável ao desenvolvimento de biotecnologias, o estudo apresenta alinhamento contributivo com o ODS 3 - Saúde e Bem-Estar, especialmente a meta 3.d, que inclui o gerenciamento de riscos sanitários e monitora infecções por microrganismos resistentes, e com o ODS 9 - Indústria, Inovação e Infraestrutura, particularmente a meta 9.5, voltada ao fortalecimento da pesquisa científica e da capacidade tecnológica. Trata-se de alinhamento temático, e não de mensuração direta dos indicadores dos ODS (UNITED NATIONS, 2026a, 2026b).

O estudo teve dois objetivos centrais: avaliar o controle in vitro de uma biblioteca de oito bacteriófagos sobre 23 cepas clínicas de *P. aeruginosa* e refinar um coquetel derivado dessa biblioteca, reduzindo o número de fagos sem comprometer sua cobertura ou o controle do crescimento. Para isso, foram articulados teste de microgotas, eficiência de plaqueamento, ensaios de retirada de componentes e acompanhamento temporal entre 0 e 12 h; adicionalmente, investigou-se se a amplitude de hospedeiros e o EOP dos fagos presentes na formulação final se associavam à supressão do crescimento bacteriano.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Pseudomonas aeruginosa, resistência e biofilme na otite

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa oportunista encontrada com maior frequência em otites complicadas, recorrentes ou submetidas anteriormente a antimicrobianos. A importância clínica não decorre apenas de sua presença, mas da combinação entre persistência, capacidade de colonizar superfícies e opções terapêuticas frequentemente restritas. Em casos crônicos, exsudato, estreitamento do conduto e alterações do epitélio ainda reduzem o contato entre o medicamento e a população bacteriana, de modo que limpeza, controle da inflamação e tratamento do fator primário permanecem partes inseparáveis do manejo (BAJWA, 2019; SECKER; SHAW; ATTERBURY, 2023).

A membrana externa de bactérias Gram-negativas limita a entrada de determinadas moléculas. Em *P. aeruginosa*, a seletividade ou perda de porinas pode diminuir ainda mais essa permeabilidade, enquanto bombas de efluxo transportam substâncias para fora da célula ou do envelope bacteriano. Se um antibiótico entra em quantidade reduzida ou é removido

mais rapidamente do que se acumula, pode não alcançar concentração suficiente no alvo. Esses mecanismos podem atuar junto a mutações e genes adquiridos, explicando por que o tratamento deve ser orientado pelo perfil da cepa em vez de presumir suscetibilidade uniforme (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; SECKER; SHAW; ATTERBURY, 2023).

O biofilme acrescenta uma barreira de natureza diferente. A matriz extracelular mantém as células aderidas, altera a difusão de algumas substâncias e forma microambientes com disponibilidade desigual de oxigênio e nutrientes. Parte da população cresce lentamente ou entra em estados de baixa atividade metabólica, tornando-se menos afetada por antibióticos que dependem de processos celulares ativos. Células sobreviventes podem repovoar a superfície após o tratamento, favorecendo persistência e recorrência (TUON et al., 2022). Neste estudo, o biofilme fundamenta a relevância terapêutica, mas não foi mensurado experimentalmente.

Esses limites não significam que fagos sejam automaticamente eficazes. A baixa permeabilidade e o efluxo de pequenas moléculas não correspondem aos principais passos da infecção viral, mas receptores podem estar ausentes ou modificados, a matriz pode dificultar o acesso à célula e sistemas bacterianos de defesa podem interromper o ciclo fágico. A utilidade dos fagos depende, portanto, de demonstrar suscetibilidade e produtividade em cada combinação relevante (EGIDO et al., 2022; HOLTAPPELS; ALFENAS-ZERBINI; KOSKELLA, 2023).

Bacteriófagos, espectro de hospedeiros e coquetéis

No ciclo lítico, o fago adsorve-se a um receptor da superfície bacteriana, injeta seu genoma, utiliza a maquinaria do hospedeiro para produzir novas partículas e promove lise celular ao final do ciclo. O mecanismo permite amplificação onde existem bactérias permissivas e diferencia os fagos de antimicrobianos químicos administrados em dose fixa. A mesma dependência de receptores e processos intracelulares, contudo, explica a especificidade frequentemente observada dentro de uma única espécie bacteriana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; HOLTAPPELS; ALFENAS-ZERBINI; KOSKELLA, 2023).

A especificidade pode preservar parte da microbiota não alvo, mas exige que o espectro de hospedeiros seja determinado em coleções clínicas. Resultados obtidos em uma cepa de referência não podem ser generalizados para todas as cepas de *P. aeruginosa*, pois diferenças em receptores, cápsula, sistemas de defesa e estado fisiológico interferem no sucesso da infecção. Coquetéis reúnem fagos distintos para ampliar a cobertura e reduzir a dependência de uma única interação, mas uma formulação maior não é necessariamente superior: componentes sobrepostos podem ser redundantes e interações competitivas podem alterar o efeito conjunto (MELO et al., 2019; EGIDO et al., 2022; KOVACS et al., 2024a).

Alguns fagos produzem depolimerases ou outras enzimas capazes de degradar componentes da matriz extracelular. Essa propriedade sustenta a hipótese de uma ação dupla, com lise das células suscetíveis e desorganização parcial da matriz. Entretanto, a atividade antibiofilme precisa ser medida diretamente e não pode ser inferida de halos, EOP ou curvas de crescimento planctônico. A literatura demonstra potencial em condições específicas, mas não autoriza atribuir essa função a todo fago ou coquetel (KOVACS et al., 2024b).

Em cães com otite por *P. aeruginosa*, Hawkins et al. (2010) observaram redução bacteriana e melhora clínica após aplicação tópica de uma mistura de fagos. Kwon et al. (2025) também avaliaram formulações fágicas voltadas à otite canina. Esses estudos mostram plausibilidade de aplicação no conduto auditivo, porém não eliminam a necessidade de selecionar fagos para as cepas de interesse nem permitem converter um resultado *in vitro* em eficácia clínica.

A seleção experimental deve separar fenômenos que respondem a perguntas diferentes. O teste de microgotas é eficiente para triagem, mas o clareamento pode decorrer de lise por alta multiplicidade ou de componentes do lisado sem replicação viral eficiente. O EOP compara o título na cepa testada ao título no hospedeiro de referência e verifica a produtividade relativa. Por fim, o ensaio de acompanhamento temporal acompanha a turbidez e revela supressão, crescimento residual ou recuperação aparente. A diferença normalizada entre as áreas sob as curvas do controle e do tratamento constitui o índice do ensaio em meio líquido (Liquid Assay Score, LAS), que resume a supressão do crescimento ao longo do intervalo (XIE; WAHAB; GILL, 2018). Como a OD600 não distingue células viáveis, detritos e alterações morfológicas, seus resultados devem ser interpretados como crescimento aparente e, quando possível, complementados por contagens de viabilidade (KESISOGLOU et al., 2022).

3. METODOLOGIA

Delineamento e local de execução

As atividades experimentais deste estudo foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular e Virologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em São Paulo, SP, no período de agosto de 2025 a agosto de 2026.

Foi realizado um estudo experimental in vitro, de abordagem quantitativa, para avaliar interações entre cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e bacteriófagos de uma biblioteca laboratorial. O delineamento compreendeu triagem pelo teste de microgotas, quantificação por eficiência de plaqueamento, ensaios de contribuição individual para

refinamento do coquetel e ensaios de acompanhamento temporal de 0 a 12 h com a formulação final. Não houve coleta direta em animais nem ensaio de biofilme nesta iniciação científica. As atividades microbiológicas foram conduzidas sob condições de nível de biossegurança 2 e o material foi descartado conforme as normas institucionais.

Origem e manutenção das cepas bacterianas

Foram recebidas 23 culturas previamente separadas e identificadas como *P. aeruginosa*, todas provenientes de casos de otite externa canina. As culturas foram encaminhadas pela Dra. Dyana Alves Henriques, do Centro Universitário São Camilo/Unidade Veterinária Especializada Dognostic. De cada cultura foi selecionada uma colônia isolada para originar o estoque clonal utilizado nos ensaios; por esse motivo, as unidades experimentais são denominadas cepas bacterianas ao longo do artigo. O estudo não realizou coleta por swab, isolamento primário nem nova bateria de identificação; a identidade da espécie foi adotada conforme o fluxo diagnóstico da instituição fornecedora.

Após o recebimento, as culturas foram reativadas em meios de rotina. As culturas C123U, F10oD e F59N apresentaram crescimento concomitante incompatível com pureza e foram submetidas a ágar cetrimida com incubação a 42 °C para recuperação seletiva e descontaminação. Esse procedimento foi pontual e não foi interpretado como nova confirmação taxonômica. As culturas purificadas foram preservadas em caldo triptona de soja com 15% de glicerol a -80 °C.

Bacteriófagos, propagação e titulação

Os bacteriófagos BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP4, BrSP5, BrSP6, BrSP8 e BrSP9 pertencem à coleção biológica ativa do Laboratório de Biologia Molecular e Virologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Os estoques de trabalho foram propagados em seus respectivos hospedeiros de referência, apresentados no Quadro 1, em meio líquido TSB. Para o processamento das suspensões, adicionaram-se 20 µL de clorofórmio a 980 µL da cultura, seguindo-se agitação em vórtex durante 3 minutos e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante aquoso para recuperação das partículas fágicas. As suspensões foram conservadas em tampão SM, pH 7,5, a 4 °C e tituladas em triplicata pelo método da dupla camada de ágar, com determinação da concentração em unidades formadoras de placas por mililitro, PFU/mL (ADAMS, 1959).

Quadro 1. Bacteriófagos da coleção e respectivas cepas hospedeiras de referência.

Bacteriófago	**Identificação original**	**Cepa hospedeira**	**Número da cepa**
BrSP1	SP01	Lfar01	34
BrSP2	SP02	EQSM02	14
BrSP3	SP03	BOCP01	23
BrSP4	SP04	ROSM01	26
BrSP5	SP05	ROSM01	26
BrSP6	SP06	ROSM01	26
BrSP8	SP08	CASM05	11
BrSP9	SP09	CASM05	11

Fonte: dados da coleção biológica do Laboratório de Biologia Molecular e Virologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

No teste de microgotas, todas as combinações fago-cepa foram avaliadas com 200 PFU e 20 PFU em alíquotas de 20 µL. Nos ensaios de acompanhamento temporal, cada componente do coquetel estava presente a 5×10^7 PFU/mL antes da aplicação; a adição de 20 µL do coquetel forneceu 1×10^6 PFU de cada fago por microtubo.

Teste de microgotas e eficiência de plaqueamento

Para cada cepa, 1 mL de cultura cultivada durante a noite foi incorporado a 5 mL de TSB semissólido com agarose e distribuído sobre base de ágar triptona de soja. Após a solidificação, aplicaram-se separadamente 20 µL com 200 PFU e 20 PFU de cada fago. As gotas foram absorvidas antes da incubação invertida a 37 °C por 24 h. Foram incluídos tapete sem fago e controle do diluente. Considerou-se positiva a lise reprodutível e atribuível ao fago; combinações discordantes ou com artefatos foram repetidas.

As combinações selecionadas foram quantificadas por dupla camada. O EOP foi calculado pela razão entre o título na cepa testada e o título do mesmo fago em seu hospedeiro de referência: cepa 34 para BrSP1; cepa 14 para BrSP2; cepa 23 para BrSP3; cepa 26 para BrSP4, BrSP5 e BrSP6; e cepa 11 para BrSP8 e BrSP9. Adotou-se EOP alto quando $\geq 0,5$; médio quando $0,1 \leq EOP < 0,5$; baixo quando $0,001 \leq EOP < 0,1$; e ineficiente quando $EOP < 0,001$. Ausência de placas detectáveis foi registrada como 0, sem implicar

ausência absoluta abaixo do limite de detecção (TELLEZ-CARRASQUILLA; SALAZAR-OSPINA; JIMÉNEZ, 2024).

Coquetel refinado e ensaio de acompanhamento temporal de 12 horas

A formulação inicial continha BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP4, BrSP5, BrSP6, BrSP8 e BrSP9. Para determinar se BrSP4 e BrSP9 contribuíam para o desempenho conjunto, foram comparadas três condições: bactéria sem fago, bactéria com o coquetel completo e bactéria com o coquetel sem o fago de interesse. A subtração de BrSP4 foi avaliada em C181C e C176O, e a de BrSP9 em C19oD, C146O e 1131R. Nas formulações de subtração, somente o componente investigado foi omitido, mantendo-se a dose dos demais fagos.

O critério de permanência foi funcional: um componente deveria acrescentar controle de forma consistente ou ampliar cobertura não fornecida pelos demais. BrSP4 e BrSP9 não apresentaram ganho adicional consistente entre as cepas avaliadas e sua cobertura estava sobreposta à de fagos mantidos na formulação. Ambos foram retirados, resultando no coquetel composto por BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP5, BrSP6 e BrSP8. A análise temporal principal foi restrita a 0 a 12 h e comparou, para cada cepa, bactéria sem fago e bactéria tratada com o coquetel refinado.

Para cada cepa, o inóculo bacteriano foi padronizado em TSB para OD600 próxima de 0,055. Em seguida, 980 µL da suspensão foram distribuídos em três microtubos por condição. Os controles receberam 20 µL de tampão SM e os tratamentos, 20 µL do coquetel correspondente, totalizando 1 mL por microtubo e 3 mL por condição. Como cada componente estava a 5×10^7 PFU/mL antes da aplicação, cada microtubo recebeu 1×10^6 PFU de cada fago, equivalente à concentração final de 1×10^6 PFU/mL por componente.

De cada microtubo, alíquotas de 200 µL foram distribuídas em duplicata em placa de microtitulação de 96 poços, utilizada para crescimento das culturas e leitura seriada da absorbância. As duplicatas foram organizadas em duas fileiras de três poços por condição. A placa foi mantida a 37 °C e 110 rpm em incubadora orbital New Brunswick Classic C24, e a OD600 foi registrada no início e a cada 2 h até 12 h. Assim, cada condição gerou três réplicas técnicas independentes de preparo e seis leituras técnicas de OD600. As médias e os SEMs foram calculados a partir dos seis poços, reconhecendo-se que cada par provinha do mesmo microtubo e, portanto, não correspondia a uma nova cultura biologicamente independente.

Cada cepa foi avaliada em um único experimento independente, iniciado a partir de uma cultura bacteriana (n biológico = 1). No controle de C29oD, o poço D2 foi excluído de toda a trajetória por erro de pipetagem previamente documentado, resultando em cinco leituras técnicas no controle e seis no coquetel. O TSB foi utilizado como branco, sem

subtração matemática posterior dos valores de fundo. O MOI não foi determinado, pois o inóculo foi padronizado por OD600 sem quantificação em CFU/mL.

Tratamento dos dados

Os cálculos de média, erro-padrão da média (SEM = s/√n), supressão percentual e área sob a curva (AUC) foram realizados no Microsoft Excel para Microsoft 365, versão 2608. A supressão do crescimento no ponto de 12 h foi calculada como [1 - (OD600 do coquetel/OD600 do controle)] × 100. A AUC entre 0 e 12 h foi obtida pelo método trapezoidal. O índice do ensaio em meio líquido (Liquid Assay Score, LAS) foi calculado como [(AUC do controle - AUC do coquetel)/AUC do controle] × 100, conforme Xie, Wahab e Gill (2018). Desse modo, a supressão no ponto final expressa apenas a diferença observada em 12 h, enquanto o LAS integra toda a trajetória de crescimento entre 0 e 12 h.

Para a descrição dos perfis, adotaram-se limiares operacionais tanto para a supressão final quanto para o LAS: ≥ 80% como forte, entre 30% e 79,9% como parcial e < 30% como limitada; OD600 ≤ 0,10 indicou manutenção próxima ao nível basal de absorbância. Esses critérios foram exclusivamente descritivos. Para relacionar EOP e controle cinético, consideraram-se apenas BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP5, BrSP6 e BrSP8. Em cada uma das 17 cepas, foram obtidos o maior EOP entre esses seis componentes e o número de fagos com EOP alto (≥ 0,5). Essas variáveis e a amplitude de hospedeiros foram comparadas ao LAS de 0 a 12 h e à supressão no ponto final pelo coeficiente de correlação de Spearman, calculado no Python 3.12.13 com a biblioteca SciPy 1.17.0 (função scipy.stats.spearmanr), utilizando testes bicaudais e nível exploratório de 5%, sem ajuste para comparações múltiplas. Cada cepa contribuiu com uma observação, impedindo a pseudorreplicação dos poços técnicos.

Como cada cepa foi avaliada em apenas um experimento biologicamente independente, as comparações entre controle e tratamento foram consideradas descritivas. As correlações foram interpretadas como análises exploratórias e geradoras de hipóteses, não como evidências inferenciais ou causais definitivas. Os SEMs representam exclusivamente a dispersão entre as leituras técnicas obtidas dos poços.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Suscetibilidade no teste de microgotas

Das 23 cepas, 17 (73,9%) apresentaram lise reprodutível frente a pelo menos um dos oito fagos. BrSP8 teve a maior amplitude, com 11/23 hospedeiros, seguido por BrSP1 (10/23),

BrSP6 (8/23), BrSP3 (7/23), BrSP4 (6/23), BrSP5 (5/23) e BrSP2 e BrSP9 (3/23 cada). Seis cepas não apresentaram lise nas condições testadas.

A distribuição descontínua de sinais positivos confirma que a suscetibilidade depende do par fago-hospedeiro. A amplitude de BrSP8 e BrSP1 favoreceu sua permanência como componentes centrais, mas o número de cepas lisadas não foi usado isoladamente para inferir produtividade ou desempenho em caldo. Essa distinção é necessária porque o teste de microgotas pode superestimar o espectro de infecção quando o clareamento não resulta de replicação viral eficiente (MIRZAEI; NILSSON, 2015; FONG et al., 2021).

Tabela 1. Matriz de suscetibilidade das 23 cepas avaliadas pelo teste de microgotas.

Cepa	BrSP1	BrSP2	BrSP3	BrSP4	BrSP5	BrSP6	BrSP8	BrSP9
C29oD	+	+	+	+	+	+	-	-
C135O	+	-	+	-	+	+	+	-
F59N	+	-	+	+	-	+	+	-
C177O	+	-	+	+	-	+	+	-
C181C	-	-	-	+	-	+	-	-
C146O	+	-	-	-	-	-	+	+
C176O	+	-	-	+	-	+	-	-
C73E	+	+	-	-	-	-	+	-
C185O	-	-	+	-	-	-	+	-
C78oE	-	+	-	-	-	-	-	-
C39oD	+	-	-	-	-	-	-	-
C49O	-	-	+	-	-	-	-	-
C48o	-	-	-	-	-	-	-	-
C40oE	-	-	-	-	-	-	-	-
F85W	+	-	+	+	+	+	+	-
C75O	-	-	-	-	-	-	+	-
C123U	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-
1131R	-	-	-	-	+	-	+	+
C130e	-	-	-	-	-	-	-	-
F1o	-	-	-	-	-	-	-	-
C19oD	+	-	-	-	+	+	+	+
F10oD	-	-	-	-	-	-	+	-
Cobertura	10/23	3/23	7/23	6/23	5/23	8/23	11/23	3/23

Fonte: elaboração própria a partir dos dados experimentais. Cobertura expressa como número de cepas positivas em 23 avaliadas.

Eficiência de plaqueamento

Em 52 combinações fago-cepa, a titulação produziu placas detectáveis e permitiu calcular a capacidade infectiva relativa pelo EOP: 39 combinações foram classificadas como altas e 13 como médias; não houve valores na faixa baixa. BrSP8 apresentou 11 EOPs detectáveis (nove altos e dois médios), BrSP1 apresentou dez (sete altos e três médios), e BrSP6, oito (seis altos e dois médios). BrSP4 teve seis EOPs altos e BrSP9, três, mas a presença de plaqueamento produtivo não significou contribuição exclusiva ao coquetel. A Figura 3A sintetiza a distribuição por fago. BrSP9 chegou a EOP de 6,0 em 1131R e 3,4 em

C146O, enquanto BrSP8 variou de 0,10 a 4,00, evidenciando que a produtividade é específica de cada combinação.

EOP superior a 1 indica que o título medido na cepa clínica foi maior que o obtido no hospedeiro de referência sob o mesmo protocolo, e não que todas as cepas respondem de forma equivalente. A produtividade depende das condições de cultivo, do estado do inóculo e da referência escolhida; por isso, os valores devem orientar seleção dentro do sistema experimental e não ser tratados como propriedade absoluta do fago (TELLEZ-CARRASQUILLA; SALAZAR-OSPINA; JIMÉNEZ, 2024).

Tabela 2. Eficiência de plaqueamento das 23 cepas avaliadas frente aos oito bacteriófagos.

Cepa	BrSP1	BrSP2	BrSP3	BrSP4	BrSP5	BrSP6	BrSP8	BrSP9
C29oD	1,00	1,00	1,00	1,00	2,60	0,60	0	0
C135O	0,10	0	1,00	0	0,14	0,10	1,27	0
F59N	1,50	0	0,20	1,00	0	0,78	1,00	0
C177O	1,80	0	1,00	2,50	0	0,70	1,00	0
C181C	0	0	0	2,50	0	1,00	0	0
C146O	1,00	0	0	0	0	0	0,45	3,40
C176O	2,00	0	0	1,00	0	1,57	0	0
C73E	0,50	0,40	0	0	0	0	1,00	0
C185O	0	0	0	0	0	0	2,00	0
C78oE	0	0,40	0	0	0	0	0	0
C39oD	1,00	0	0	0	0	0	0	0
C49O	0	0	0,20	0	0	0	0	0
C48o	0	0	0	0	0	0	0	0
C40oE	0	0	0	0	0	0	0	0
F85W	0,30	0	1,00	1,00	1,00	1,00	2,30	0
C75O	0	0	0	0	0	0	0,10	0
C123U	0	0	0	0	0	0	0	0
C10	0	0	0	0	0	0	0	0
1131R	0	0	0	0	1,00	0	4,00	6,00
C130e	0	0	0	0	0	0	0	0
F1o	0	0	0	0	0	0	0	0
C19oD	0,40	0	0	0	0,10	0,10	1,60	1,60
F10oD	0	0	0	0	0	0	1,30	0

Fonte: elaboração própria a partir dos dados experimentais. EOP 0 = plaqueamento não detectado nas condições do ensaio.

Refinamento funcional do coquetel

Nos ensaios de contribuição, a omissão de BrSP4 produziu OD600 de 0,0530 em C181C, frente a 0,0583 com o coquetel completo em 12 h. Em C176O, a diferença ocorreu na direção oposta e foi pequena (0,1083 sem BrSP4 e 0,1010 com o coquetel completo). A alternância do melhor resultado entre as cepas mostrou que BrSP4 não acrescentava benefício consistente na janela analisada; além disso, os hospedeiros suscetíveis a BrSP4 também eram reconhecidos por pelo menos um fago mantido na formulação.

Para BrSP9, a formulação sem o fago apresentou menor OD600 em C19oD no ponto de 12 h (0,0487 versus 0,0553). Em C146O, o coquetel completo apresentou valor discretamente menor no último ponto disponível dentro da janela (10 h), enquanto em 1131R

ambas as formulações mantiveram a OD600 próxima ao basal. BrSP9 também não forneceu cobertura exclusiva, pois suas três cepas hospedeiras suscetíveis eram reconhecidas por BrSP8 e por outros componentes. A ausência de benefício adicional consistente e a redundância funcional sustentaram sua retirada junto com BrSP4.

Tabela 3. Comparação das formulações completas e de subtração no intervalo de 0 a 12 h.

Fago / cepa	Tempo (h)	Sem o fago (média ± SEM)	Coquetel completo (média ± SEM)
BrSP4 / C181C	12	0,0530 ± 0,0013	0,0583 ± 0,0068
BrSP4 / C176O	12	0,1083 ± 0,0034	0,1010 ± 0,0036
BrSP9 / C19oD	12	0,0487 ± 0,0004	0,0553 ± 0,0019
BrSP9 / C146O	10	0,0575 ± 0,0015	0,0518 ± 0,0004
BrSP9 / 1131R	10	0,0488 ± 0,0004	0,0510 ± 0,0010

Fonte: elaboração própria. Valores de OD600; seis leituras técnicas derivadas de três microtubos por condição; n biológico = 1 por cepa. Para C146O e 1131R, 10 h foi a última leitura disponível no intervalo de 0 a 12 h.

Controle do crescimento pelo coquetel refinado em 12 horas

O coquetel refinado foi avaliado em 17 cepas com leituras comuns entre 0 e 12 h. Todos os controles bacterianos aumentaram a OD600, demonstrando janela de crescimento suficiente para detectar o efeito do tratamento. A mediana de supressão do crescimento no ponto final foi de 90,5% e a média, 73,4%; a distância entre as duas medidas decorreu de um grupo menor de respostas fracas. Doze cepas (70,6%) atingiram pelo menos 80% de supressão no ponto de 12 h. O LAS, que integra todo o intervalo, apresentou mediana de 86,0%, e 11/17 cepas atingiram pelo menos 80%. Oito cepas permaneceram praticamente sem crescimento detectável por absorbância ao final, com OD600 ≤ 0,10 no coquetel.

Os maiores valores de supressão final ocorreram em C177O (95,9%), C29oD (95,5%), C135O (95,1%), F85W (95,0%), 1131R (94,3%), F59N e C181C (94,2%). C73E, C176O, C19oD e F10oD também superaram 80%, mas apresentaram crescimento residual ao final. Em contraste, C78oE, C75O e C185O tiveram resposta parcial, enquanto C39oD (17,4%) e C49O (5,0%) permaneceram com controle limitado.

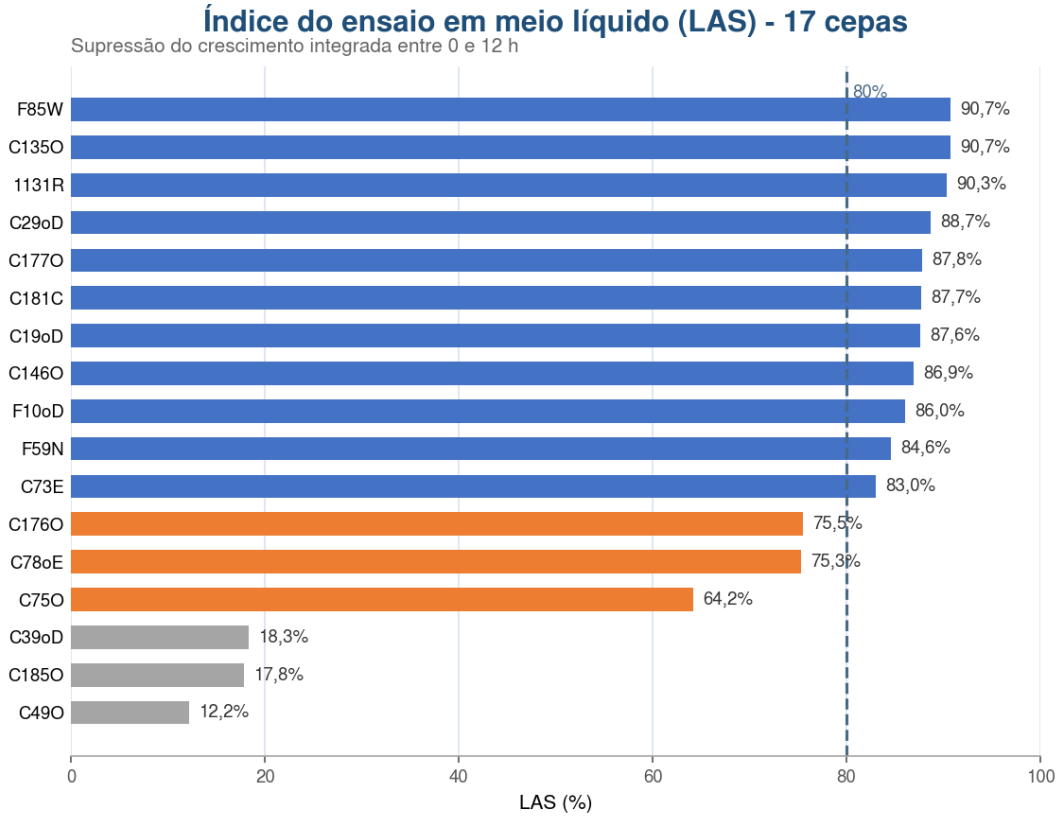
Tabela 4. Resultado consolidado do coquetel refinado em 12 h.

Cepa	Controle 12 h (média ± SEM)	Coquetel 12 h (média ± SEM)	Supressão final	LAS (0-12 h)
F85W	0,9642 ± 0,0102	0,0478 ± 0,0004	95,0%	90,7%
C29oD	1,0716 ± 0,0102	0,0487 ± 0,0002	95,5%	88,7%
C181C	0,9257 ± 0,0125	0,0535 ± 0,0013	94,2%	87,7%
F59N	0,8258 ± 0,0118	0,0475 ± 0,0009	94,2%	84,6%
C146O	1,0712 ± 0,0143	0,0770 ± 0,0023	92,8%	86,9%
C73E	1,1388 ± 0,0140	0,1953 ± 0,0242	82,8%	83,0%
C177O	1,1978 ± 0,0082	0,0487 ± 0,0004	95,9%	87,8%
C176O	0,9488 ± 0,0413	0,1373 ± 0,0045	85,5%	75,5%
C39oD	0,5078 ± 0,0093	0,4195 ± 0,0071	17,4%	18,3%
C185O	1,2577 ± 0,0127	0,8132 ± 0,0037	35,3%	17,8%
C78oE	1,1845 ± 0,0164	0,6667 ± 0,0090	43,7%	75,3%
C135O	1,0203 ± 0,0083	0,0502 ± 0,0014	95,1%	90,7%
C49O	1,3337 ± 0,0079	1,2675 ± 0,0071	5,0%	12,2%

Cepa	Controle 12 h (média ± SEM)	Coquetel 12 h (média ± SEM)	Supressão final	LAS (0-12 h)
C19oD	0,8957 ± 0,0080	0,1105 ± 0,0079	87,7%	87,6%
1131R	0,9943 ± 0,0101	0,0572 ± 0,0003	94,3%	90,3%
C75O	1,1750 ± 0,0068	0,6625 ± 0,0153	43,6%	64,2%
F10oD	1,2447 ± 0,0133	0,1182 ± 0,0073	90,5%	86,0%

Fonte: elaboração própria. LAS calculado a partir das AUC de controle e coquetel entre 0 e 12 h. Seis leituras técnicas por condição, derivadas de três microtubos, exceto o controle de C29oD (cinco leituras); n biológico = 1 por cepa.

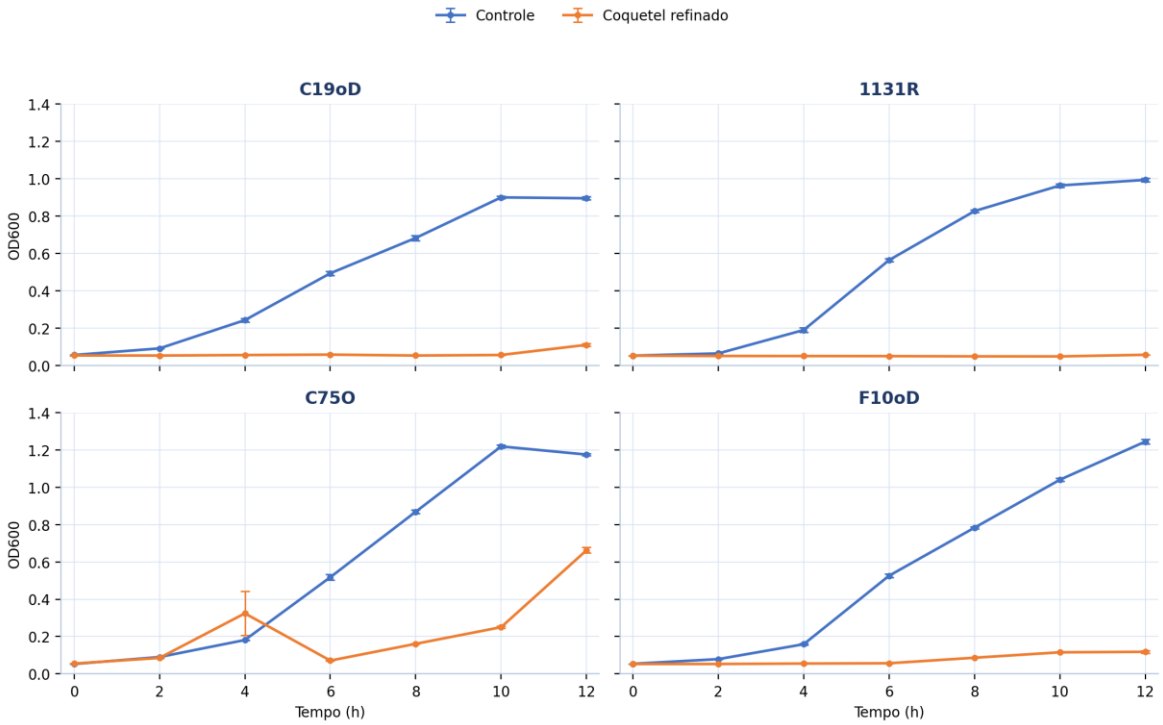
Figura 1. Índice do ensaio em meio líquido (LAS) das 17 cepas avaliadas entre 0 e 12 h.



Fonte: elaboração própria. A linha tracejada indica o limiar descritivo de 80%.

A Figura 1 apresenta o LAS, isto é, a supressão do crescimento integrada ao longo de 0 a 12 h. A mediana foi de 86,0%; 11/17 cepas (64,7%) alcançaram LAS ≥ 80%, enquanto seis permaneceram abaixo desse limiar. A amplitude de 12,2% a 90,7% evidencia resposta heterogênea e mostra por que a cobertura precisa ser verificada em painéis clínicos, mesmo quando o coquetel reúne fagos de amplo espectro.

Figura 2. Curvas de crescimento de C19oD, 1131R, C75O e F10oD, comparando controle e coquetel refinado entre 0 e 12 h.



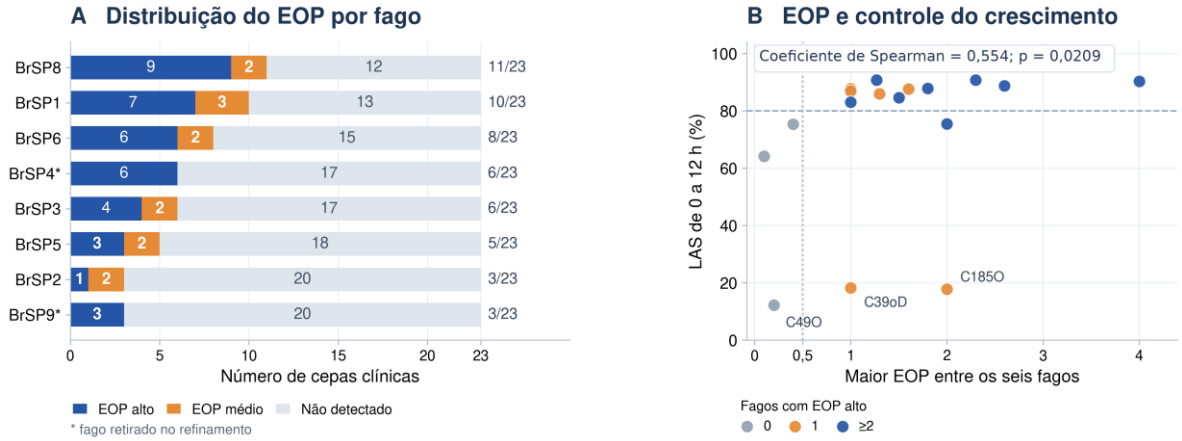
Fonte: elaboração própria. Pontos = média; barras = SEM das leituras técnicas; três microtubos e seis leituras por condição e tempo; n biológico = 1 por cepa.

As curvas representativas mostram comportamentos distintos. Em 1131R, o coquetel manteve a OD600 próxima ao basal durante todo o intervalo; em C19oD e F10oD, houve forte separação do controle com pequeno crescimento residual; e C75O exibiu resposta parcial e maior variabilidade. O LAS complementou a supressão no ponto final ao incorporar toda a trajetória. Em C78oE, por exemplo, a supressão do crescimento no ponto de 12 h foi de 43,7%, mas o LAS chegou a 75,3%, padrão compatível com controle inicial seguido de retomada do crescimento aparente. Essa diferença seria perdida se apenas a leitura de 12 h fosse considerada.

Relação entre EOP e controle cinético

Para verificar se maior produtividade em ágar se refletiu em melhor controle em caldo, os EOPs da Tabela 2 foram resumidos por cepa, considerando somente os seis fagos do coquetel refinado. Das 17 cepas, 14 apresentaram pelo menos um componente com EOP alto e três apresentaram apenas EOP médio. A mediana de LAS foi de 87,3% no primeiro grupo e 64,2% no segundo; a supressão final mediana foi de 93,5% e 43,6%, respectivamente. Essas comparações são descritivas, pois os grupos são pequenos e desiguais.

Figura 3. Distribuição da eficiência de plaqueamento e associação com o controle do crescimento bacteriano de 0 a 12 h.



Fonte: elaboração própria. (A) EOP alto ≥ 0,5; médio 0,1 ≤ EOP < 0,5; cinza = não detectado; * fagos retirados. (B) Maior EOP entre os seis fagos finais e LAS; n = 17 cepas; correlação exploratória de Spearman.

O maior EOP por cepa correlacionou-se positivamente com o LAS (coeficiente de Spearman = 0,554; p = 0,0209) e com a supressão final (coeficiente = 0,583; p = 0,0140). O número de fagos com EOP alto mostrou associação mais intensa com o LAS (coeficiente de Spearman = 0,677; p = 0,0028) e com a supressão em 12 h (coeficiente = 0,787; p = 0,0002). Portanto, tanto a presença de interações produtivas quanto a quantidade de componentes altamente produtivos associaram-se a maior controle neste painel, sem demonstrar causalidade ou efeito independente da amplitude de hospedeiros.

A amplitude de hospedeiros obtida no teste de microgotas também apresentou associação positiva com a supressão final (coeficiente de Spearman = 0,704; p = 0,0016) e com o LAS (coeficiente = 0,678; p = 0,0028). Entretanto, cobertura qualitativa e EOP respondem a perguntas distintas: a primeira descreve reconhecimento ou lise observável; o segundo quantifica a produtividade relativa da infecção. A concordância geral entre ambos fortalece sua utilização conjunta, mas não permite tratá-los como medidas intercambiáveis.

As exceções delimitam o valor preditivo do EOP. C39oD apresentou EOP máximo de 1,0, mas teve apenas 17,4% de supressão final e LAS de 18,3%; C185O atingiu EOP de 2,0, porém mostrou 35,3% de supressão e LAS de 17,8%. Em contraste, C181C e F10oD tiveram somente um fago produtivo e alcançaram LAS de 87,7% e 86,0%, respectivamente. Assim, EOP alto associou-se a maior controle, mas não o assegurou para uma cepa individual. Diferenças entre crescimento em ágar e meio líquido, resistência bacteriana e interações entre componentes podem modificar o desempenho do coquetel, como observado em comparações experimentais entre plaqueamento e ensaios cinéticos e entre fagos individuais e suas combinações (RIBEIRO et al., 2023; NIU et al., 2021).

A retirada de BrSP4 e BrSP9 reduziu o coquetel de oito para seis componentes sem eliminar cobertura exclusiva. Embora ambos exibissem EOP alto em algumas cepas, esses resultados individuais não se converteram em benefício adicional consistente nos ensaios de subtração. A formulação final - BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP5, BrSP6 e BrSP8 - controlou fortemente a maioria das cepas nas primeiras 12 h. O refinamento deve, portanto, combinar amplitude de hospedeiros, produtividade relativa e desempenho do conjunto, em vez de conservar um componente apenas porque ele apresenta EOP elevado isoladamente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação do teste de microgotas, EOP, ensaios de retirada de componentes e acompanhamento temporal permitiu avaliar níveis complementares da interação fago-hospedeiro. Das 23 cepas, 17 apresentaram lise reprodutível, e 52 combinações formaram placas detectáveis, sendo 39 de EOP alto e 13 de EOP médio. Embora BrSP4 e BrSP9 apresentassem interações altamente produtivas, a ausência de ganho consistente e a sobreposição de cobertura sustentaram sua retirada, originando o coquetel composto por BrSP1, BrSP2, BrSP3, BrSP5, BrSP6 e BrSP8.

Os dois objetivos centrais foram atingidos no intervalo analisado. A biblioteca apresentou atividade contra 17/23 cepas, e o refinamento reduziu a formulação de oito para seis fagos sem perda observada de cobertura exclusiva. Com o coquetel refinado, 12/17 cepas apresentaram supressão ≥ 80% em 12 h, com mediana de 90,5%; o LAS alcançou mediana de 86,0%, com 11/17 cepas acima de 80%. O maior EOP por cepa associou-se ao LAS (coeficiente de Spearman = 0,554), enquanto o número de fagos com EOP alto mostrou associação mais intensa (coeficiente = 0,677), indicando que a produtividade relativa e o número de componentes altamente produtivos se associaram ao controle.

O EOP alto, entretanto, não garantiu resposta para todas as cepas: C39oD e C185O mantiveram controle limitado ou parcial apesar de apresentarem ao menos um fago altamente produtivo. A seleção de formulações deve, portanto, integrar plaqueamento e acompanhamento temporal, preservando o caráter descritivo dos resultados obtidos com uma única cultura biologicamente independente por cepa. Os achados não permitem inferir causalidade, eficácia clínica ou atividade antibiofilme.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. H. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers, 1959. p. 450-451.

BAJWA, J. Canine otitis externa - treatment and complications. The Canadian Veterinary Journal, Ottawa, v. 60, n. 1, p. 97-99, 2019. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6294027/. Acesso em: 4 abr. 2025.

EGIDO, J. E.; COSTA, A. R.; APARICIO-MALDONADO, C.; HAAS, P. J.; BROUNS, S. J. J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. FEMS Microbiology Reviews, v. 46, n. 1, fuab048, 2022. DOI: 10.1093/femsre/fuab048.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; CÔTÉ, E. Tratado de medicina veterinária: doenças do cão e do gato. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.

FONG, K.; WONG, C. W. Y.; WANG, S.; DELAQUIS, P. How broad is enough: the host range of bacteriophages and its impact on the agri-food sector. Phage, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2021. DOI: 10.1089/phage.2020.0036.

HAWKINS, C. et al. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. Veterinary Microbiology, v. 146, n. 3-4, p. 309-313, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.014.

HOLTAPPELS, D.; ALFENAS-ZERBINI, P.; KOSKELLA, B. Drivers and consequences of bacteriophage host range. FEMS Microbiology Reviews, v. 47, n. 4, fuad038, 2023. DOI: 10.1093/femsre/fuad038.

KESISOGLOU, I.; TAM, V. H.; TOMARAS, A. P.; NIKOLAOU, M. Discerning in vitro pharmacodynamics from OD measurements: a model-based approach. Computers & Chemical Engineering, v. 158, 107617, 2022. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2021.107617.

KOVACS, C. J. et al. Combinations of bacteriophage are efficacious against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and enhance sensitivity to carbapenem antibiotics. Viruses, v. 16, n. 7, p. 1000, 2024a. DOI: 10.3390/v16071000.

KOVACS, C. J. et al. Disruption of biofilm by bacteriophages in clinically relevant settings. Military Medicine, v. 189, n. 5-6, p. e1294-e1302, 2024b. DOI: 10.1093/milmed/usad385.

KWON, J. et al. Tailoring formulation for enhanced phage therapy in canine otitis externa: a cocktail approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus pseudintermedius*. Veterinary Microbiology, v. 301, 110354, 2025. DOI: 10.1016/j.vetmic.2024.110354.

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, art. 134, 2019. DOI: 10.1186/s12866-019-1481-z.

MIRZAEI, M. K.; NILSSON, A. S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. PLOS ONE, v. 10, n. 3, e0118557, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0118557.

NIU, Y. D. et al. Efficacy of individual bacteriophages does not predict efficacy of bacteriophage cocktails for control of *Escherichia coli* O157. Frontiers in Microbiology, v. 12, art. 616712, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616712.

RIBEIRO, J. M. et al. Comparative analysis of effectiveness for phage cocktail development against multiple Salmonella serovars and its biofilm control activity. Scientific Reports, v. 13, art. 13054, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-40228-z.

SECKER, B.; SHAW, S.; ATTERBURY, R. J. *Pseudomonas spp.* in canine otitis externa. Microorganisms, v. 11, n. 11, p. 2650, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11112650.

TELLEZ-CARRASQUILLA, S.; SALAZAR-OSPINA, L.; JIMÉNEZ, J. N. High activity and specificity of bacteriophage cocktails against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae belonging to the high-risk clones CG258 and ST307. Frontiers in Microbiology, v. 15, 1502593, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1502593.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TUON, F. F. et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. Pathogens, v. 11, n. 3, p. 300, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11030300.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Goal 3: Ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages. New York, 2026a. Disponível em: https://sdgs.un.org/goals/goal3. Acesso em: 20 ago. 2026.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Goal 9: Build resilient infrastructure, promote inclusive and sustainable industrialization and foster innovation. New York, 2026b. Disponível em: https://sdgs.un.org/goals/goal9. Acesso em: 20 ago. 2026.

XIE, Y.; WAHAB, L.; GILL, J. J. Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence. Viruses, v. 10, n. 4, art. 189, 2018. DOI: 10.3390/v10040189.

Contatos: 10419851@mackenzista.com.br e joseluiz.wolff@mackenzie.br