



INBIO - INSTITUTO DE BIOLOGIA

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TATIANA MARIA LOPES CANUTO DE SOUZA

**Avaliação das condições de cultivo de bacteriófagos de *Klebsiella*
*quasipneumoniae***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Uberlândia

2024

TATIANA MARIA LOPES CANUTO DE SOUZA

**Avaliação das condições de cultivo de bacteriófagos de *Klebsiella*
*quasipneumoniae***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à graduação de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de graduação.

Orientador: Jonny Yokosawa

Uberlândia

2024

Tatiana Maria Lopes Canuto de Souza

Avaliação das condições de cultivo de bacteriófagos de *Klebsiella quasipneumoniae*.

Tatiana Maria Lopes Canuto de Souza. – Uberlândia, 2024-26 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Jonny Yokosawa

Trabalho de conclusão de curso – INBIO - INSTITUTO DE BIOLOGIA

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2024.

IMPORTANTE: Esse é apenas um texto de exemplo da Ficha Catalográfica. Deverá ser substituída pela Ficha Catalográfica fornecida pela biblioteca da sua instituição.

Tatiana Maria Lopes Canuto de Souza

**Avaliação das condições de cultivo de bacteriófagos de
*Klebsiella quasipneumoniae***

Trabalho aprovado.

Jonny Yokosawa

Orientador

Ismin Aparecida Cunha Araújo

Convidado 1

Flávia Batista Ferreira

Convidado 2

Uberlândia

2024

Dedicatória. . .

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me guiar em cada passo dessa jornada, e ao meu marido e filhos, pelo apoio incondicional e paciência durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador, Professor Jonny, que com paciência, dedicação e sabedoria soube me orientar e incentivar ao longo deste trabalho. Suas valiosas orientações e seu vasto conhecimento foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Sou profundamente grato por todo o apoio e ensinamentos transmitidos ao longo deste processo.

E ao meu amigo Pedro, que, mesmo em sua jornada no mestrado, encontrou tempo e disposição para me apoiar e compartilhar conhecimentos. Sua amizade, incentivo e ajuda foram essenciais para superar os desafios e alcançar este importante marco.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero agradecimento.

Agradecimentos

Chegar até aqui foi uma jornada repleta de desafios, aprendizados, risadas, e, claro, algumas noites em claro. Ao olhar para trás, é impossível não perceber quantas pessoas fizeram parte dessa caminhada, cada uma delas sendo essencial para que este trabalho se tornasse realidade.

Primeiramente, preciso agradecer ao Professor Jonny, meu orientador. Sua paciência, compreensão e, principalmente, a forma como soube me guiar por este caminho acadêmico foram fundamentais. Nos momentos em que me sentia perdido, você sempre esteve ali, com conselhos certos e aquela calma que me lembrava que, no final, tudo se resolveria. Obrigado por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidava dele.

Ao Pedro, meu amigo e companheiro de muitas batalhas. Você, em meio ao seu mestrado, sempre encontrava tempo para tirar minhas dúvidas e compartilhar insights valiosos. Não foi só sua ajuda técnica que fez a diferença, mas sua presença constante e encorajamento. Nos momentos em que pensei que não conseguiria, você me lembrou do que eu sou capaz. Que sorte a minha ter você ao meu lado!

Aos meus professores, por cada aula, orientação e por despertarem em mim o desejo de sempre buscar mais. Vocês foram mais do que mestres, foram inspirações ao longo de todo esse percurso.

A minha família, minha base em todos os momentos. Obrigado por cada palavra de incentivo, pelo apoio constante e por acreditarem em mim quando tudo parecia desmoronar. Este trabalho também é de vocês. Marido, filhos e irmã, suas orações e o

amor incondicional foram a força motriz para que eu superasse cada obstáculo. Sem vocês, eu jamais teria chegado até aqui.

E, claro, não poderia deixar de agradecer aos meus fiéis companheiros de quatro patas. Meus 6 cães, que, nos momentos de maior estresse, estiveram ao meu lado, oferecendo um conforto silencioso, mas tão necessário. Suas travessuras e olhares carinhosos trouxeram leveza nos dias mais pesados.

Por fim, agradeço a todos os amigos, colegas e pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Este TCC é resultado não apenas de esforços individuais, mas de uma rede de apoio inestimável que esteve comigo em cada passo.

A todos, meu sincero e profundo obrigado.

Resumo

A resistência bacteriana a antibióticos continua a ser um desafio crítico para a saúde pública, ressaltando a importância de se investigar alternativas terapêuticas. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes condições de cultivo de bacteriófagos direcionados a *Klebsiella quasipneumoniae*, uma bactéria oportunista que pode apresentar cepas resistentes a múltiplos antibióticos. Foram utilizados quatro bacteriófagos isolados de uma amostra do Rio Aricanduva, em São Paulo, juntamente com a cepa bacteriana utilizada no seu isolamento. As variáveis testadas incluíram a adição de $MgSO_4$ e/ou $CaCl_2$ ao meio de cultura e incubação em temperaturas de 30 °C e 37 °C. Os resultados indicaram que tanto a temperatura quanto a adição dos sais ao meio não impactaram significativamente a replicação dos fagos. A otimização do cultivo dos fagos, com o objetivo de aumentar sua produção, é essencial para a potencial utilização desses bacteriófagos como alternativa viável para o controle de infecções causadas por *K. quasipneumoniae* e *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: Bacteriófago, *Klebsiella quasipneumoniae*, fagoterapia, resistência a antimicrobianos.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics continues to be a critical challenge for public health, highlighting the importance of investigating alternative therapeutic options. This study aimed to evaluate different cultivation conditions of bacteriophages of *Klebsiella quasipneumoniae*, an opportunistic bacterium that may present strains that are resistant to multiple antibiotics. Four bacteriophages isolated from a sample of the Aricanduva River, in São Paulo, were used, along with the bacterial strain that was used to isolate them. The variables tested included addition of MgSO_4 and/or CaCl_2 to the culture medium and incubation at temperatures of 30 °C and 37 °C. The results indicated that the different conditions did not significantly impact replication of the phages. Optimization of the phage cultivation, in order to increase its production, is essential for the potential use of bacteriophages as a viable alternative for controlling *K. quasipneumoniae* and *K. pneumoniae* infections.

Keywords: Bacteriophage, *Klebsiella quasipneumoniae*, phage therapy, antimicrobial resistance.

1. Introdução

A resistência bacteriana é uma das maiores preocupações de saúde pública global, exacerbada pelo uso indiscriminado de antibióticos. Muitas bactérias têm adquirido e propagado genes de resistência, dificultando o tratamento eficaz de infecções graves. Um exemplo disso é a *Klebsiella quasipneumoniae*, pertencente ao complexo *Klebsiella pneumoniae*, que tem se destacado por sua característica de algumas de suas cepas apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos, especialmente em ambientes hospitalares (EFFAH *et al.*, 2020). Essa bactéria oportunista é conhecida por causar infecções graves, como pneumonia, infecções urinárias e septicemia, especialmente em pacientes imunocomprometidos, o que torna sua erradicação extremamente difícil (CASSINI *et al.*, 2019)

O uso extensivo de antibióticos, particularmente de amplo espectro como os carbapenemos, gerou pressão seletiva sobre bactérias como a *K. quasipneumoniae*, resultando no surgimento de cepas multirresistentes. Com a eficácia reduzida dos antibióticos disponíveis, surgem infecções difíceis de se tratar, aumentando a morbidade e a mortalidade, especialmente em ambientes hospitalares (VENTOLA, 2015). O desenvolvimento de alternativas terapêuticas tornou-se uma prioridade e os bacteriófagos (fagos) são uma dessas soluções promissoras (GÓRSKI *et al.*, 2012).

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias com alta especificidade, permitindo que ataquem bactérias-alvo sem prejudicar a microbiota benéfica do hospedeiro (CLOKIE *et al.*, 2011). Eles podem se replicar por dois principais ciclos: o ciclo lítico, no qual o fago usa a célula bacteriana para produzir novas partículas virais, levando à ruptura da célula hospedeira, e o ciclo lisogênico, em que o DNA do fago se integra ao genoma bacteriano, permanecendo latente até ser ativado (PRINCIPI; SILVESTRI; ESPOSITO, 2019). Bacteriófagos são os organismos mais abundantes do planeta, encontrados em ambientes como solos, águas doces e salgadas, e intestinos de animais, com concentrações muito altas em ambientes aquáticos (DION *et al.*, 2020). Além disso, ao contrário dos antibióticos, os fagos coevoluem com suas bactérias hospedeiras, uma

característica que lhes permite superar a resistência bacteriana ao longo do tempo (KORTRIGHT *et al.*, 2019).

A *K. quasipneumoniae* é uma bactéria capaz de formar biofilmes, estruturas altamente organizadas de células bacterianas aderidas a superfícies e protegidas por uma matriz extracelular, frequentemente associadas a dispositivos médicos como cateteres e ventiladores. Esses biofilmes representam um desafio significativo no tratamento com antibióticos devido à sua resistência intrínseca (GORSKI *et al.*, 2020). No entanto, estudos recentes demonstraram que bacteriófagos, como o MKP-1, possuem atividade lítica eficiente contra biofilmes dessa bactéria, auxiliada pela secreção de enzimas depolimerases que degradam a matriz extracelular, expondo as células bacterianas ao ataque fágico (OSMAN *et al.*, 2023). Além disso, abordagens que combinam bacteriófagos e antibióticos mostraram eficácia aumentada na eliminação de biofilmes e na redução da densidade bacteriana, evidenciando o potencial da fagoterapia como uma ferramenta terapêutica promissora contra infecções crônicas e multirresistentes (DAS, KALEDHONKAR, 2024).

Para que a fagoterapia seja viável em escala clínica, é necessário otimizar as condições de cultivo dos fagos, como a composição do meio de cultura e a temperatura de incubação, para obtenção de grande quantidade desses vírus (GILL; HYMAN, 2010). Estudos mostram que a adição de íons como Mg^{2+} e Ca^{2+} pode aumentar a eficiência da adsorção dos fagos às células bacterianas, melhorando sua replicação (HARPER *et al.*, 2014). Além disso, a temperatura também pode afetar diretamente a replicação viral, como, por exemplo, a incubação a 37 °C acelerar a replicação, mas também podem aumentar o risco de desestabilização viral (ABEDON *et al.*, 2011).

Este estudo tem como objetivo avaliar a adição de $MgSO_4$ e $CaCl_2$ ao meio de cultura, além de testar duas temperaturas de incubação (30 °C e 37 °C) para determinar quais condições favorecem a produção de fagos de *K. quasipneumoniae*. A escolha desta bactéria se justifica por sua relevância clínica e pela necessidade urgente de desenvolver novas estratégias terapêuticas de combate a infecções virais causadas por cepas multirresistentes desta bactéria (LIN, KOSKELLA, LIN, 2017).

2. Material e Métodos

2.1. Cepa Bacteriana

A cepa *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 foi gentilmente cedida pelas Profas. Dras. Rosineide Marques Ribas e Sabrina Royer do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Esta cepa foi utilizada para o isolamento e a propagação de bacteriófagos.

2.2. Cultivo Bacteriano

A *K. quasipneumoniae* foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB – triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) a 37 °C, com agitação constante de 200 rpm, até atingir a fase exponencial (OD600 ~0,6). Essa cultura foi utilizada como hospedeira para a propagação dos fagos (LI, et al.,2021).

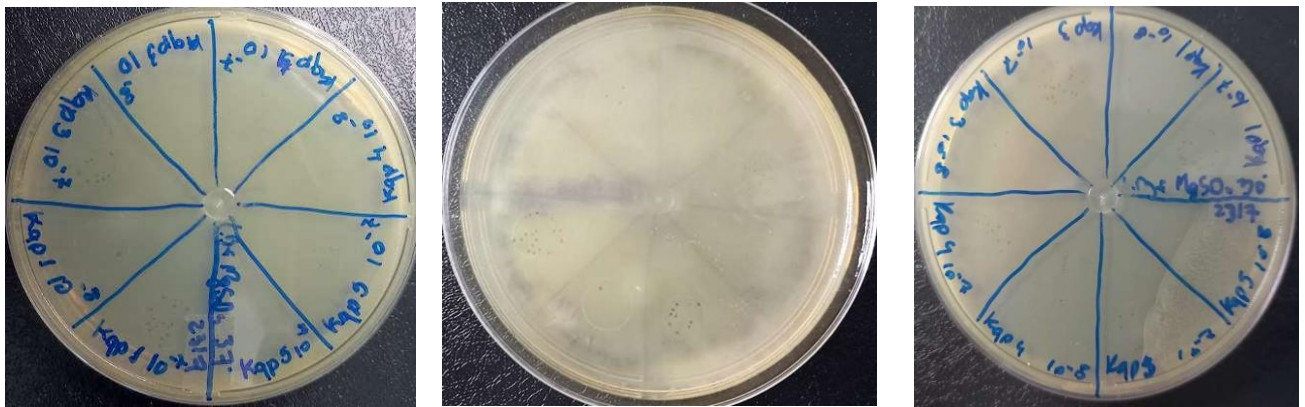
2.3. Isolamento de Bacteriófagos

Foram isolados quatro bacteriófagos (vB_Kq-KqP1, vB_Kq-KqP3, vB_Kq-KqP4 e vB_Kq-KqP5) a partir de amostra de efluente coletada no Rio Aricanduva, São Paulo. O isolamento e purificação dos bacteriófagos foram realizados pelo estudante de mestrado Pedro Antonio Moraes Souza, do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU e membro da equipe do laboratório onde o presente estudo foi feito. Para isso, os protocolos utilizados foram baseados nas metodologias descritas por Townsend et al. (2021) e Yousefi et al. (2023), com modificações. De maneira breve, a amostra do Rio Aricanduva foi tratada com clorofórmio, centrifugada e o sobrenadante foi filtrado com filtro estéril de 0,22 µm. Em seguida, uma alíquota foi adicionada à suspensão da *K. quasipneumoniae* em fase logarítmica de crescimento em caldo LB e a amostra foi incubada overnight a 37 °C sob agitação. O cultivo foi tratado com clorofórmio, centrifugado e o sobrenadante transferido para novo tubo estéril, que foi estocado a - 20 °C. Com a observação de lise com a deposição desta amostra

sobre tapete de células de *K. quasipneumoniae*, foi realizada a purificação dos fagos em três passos conforme descrito acima.

2.4. Condições de Cultivo dos Bacteriófagos

Os bacteriófagos foram inoculados, individualmente, às suspensões de bactéria e cultivados em LB, LB contendo $MgSO_4$ 10 mM, LB contendo $CaCl_2$ 10 mM ou LB contendo $MgSO_4$ 10 mM e $CaCl_2$ 10 mM. As temperaturas de incubação foram de 30 °C e 37 °C em todas as amostras testadas. Após a incubação por 12 h sob agitação em cada condição, as suspensões foram tratadas com clorofórmio, centrifugadas, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis e armazenados a -20 °C. A concentração (título) de bacteriófago obtida em cada condição foi realizada por meio de diluição seriada e contagem de unidades formadoras de placas (PFU) sendo aplicada a uma condição de controle só utilizando o LB.



Figurab1: Processo de titulação dos bacteriófagos em gramados de *K. quasipneumoniae* (ATCC 700603).v

2.5. Avaliação do Título Viral

Os títulos virais foram determinados utilizando-se a técnica de plaqueamento de diluições das amostras de fagos sobre o tapete de células de *K. quasipneumoniae* (ABEDON et al., 2011). Após a incubação, foi realizada a contagem de placas de lise da diluição apropriada e os títulos virais foram expressos em PFU/mL.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA, do tipo não paramétrico (Krusal-wallis), os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ e foi aplicado o pós teste de Dunn's para verificar diferença entre cada grupo.

3. Resultados

Para se determinar se a adição de $MgSO_4$ e/ou $CaCl_2$ e a incubação a 30 °C ou 37 °C influenciariam no cultivo dos quatro bacteriófagos isolados por nossa equipe, após a incubação, as amostras dos fagos foram submetidas à titulação, utilizando tapetes de células da *K. quasipneumoniae* e diluições de cada suspensão do vírus. Em alguns casos, a multiplicação do bacteriófago não ocorreu e o título (zero) não foi considerado (no cultivo controle do fago vB_Kq-KqP3 a 37 °C; nos cultivos do fago vB_Kq-KqP4 a 37 °C com $MgSO_4$ e com $CaCl_2$ separadamente; e nos cultivos controle, com $CaCl_2$ e com $MgSO_4/CaCl_2$ do fago vB_Kq-KqP5 a 37 °C). Os títulos virais variaram de 1×10^9 PFU/mL (vB_Kq-KqP1 a 37 °C com $MgSO_4$; vB_Kq-KqP3 a 37 °C com $CaCl_2$; vB_Kq-KqP4 a 37 °C com $MgSO_4$; vB_Kq-KqP5 a 30 °C com $MgSO_4/CaCl_2$, a 37 °C controle e com $MgSO_4$) a $7,5 \times 10^{10}$ PFU/mL (vB_Kq-KqP1 com $MgSO_4/CaCl_2$) (Figura 2). Apesar desta variação, a comparação entre as condições indicou não haver diferença estatisticamente significativa (todos os valores de p foram maiores que 0,05).

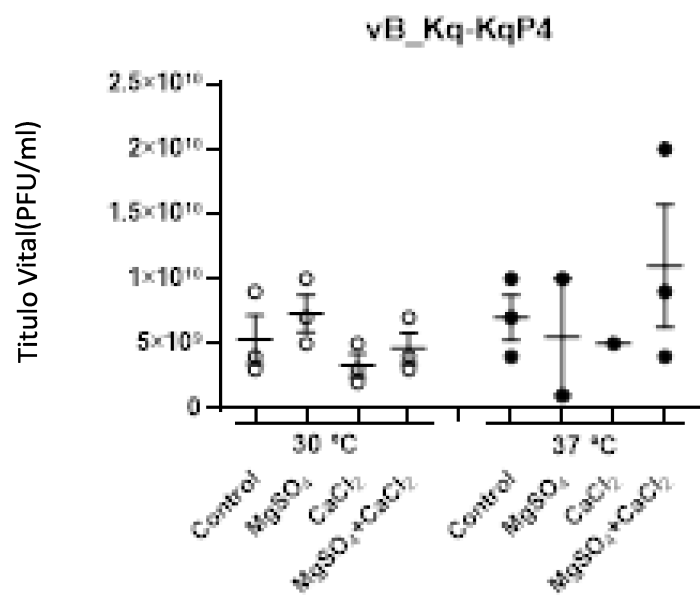
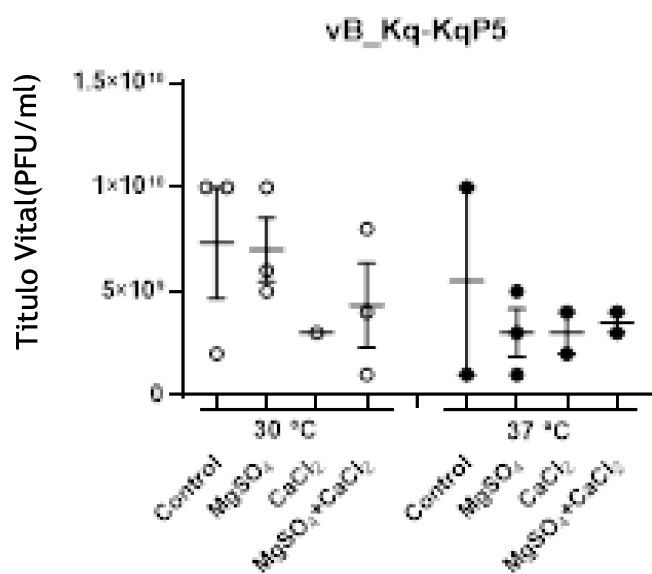
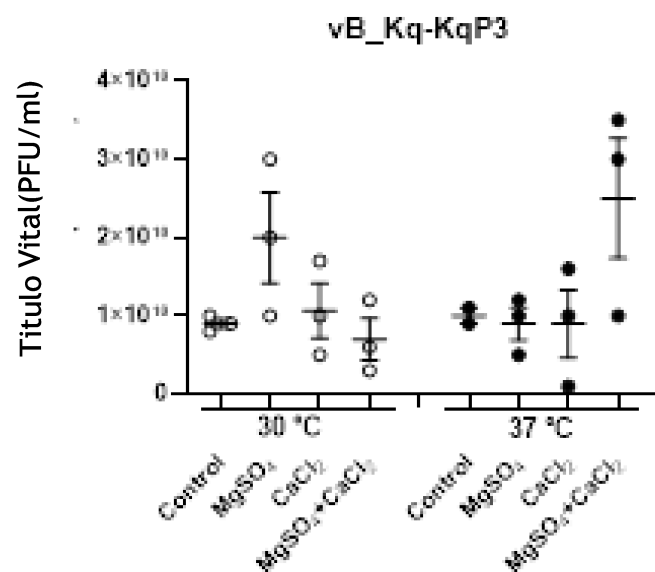
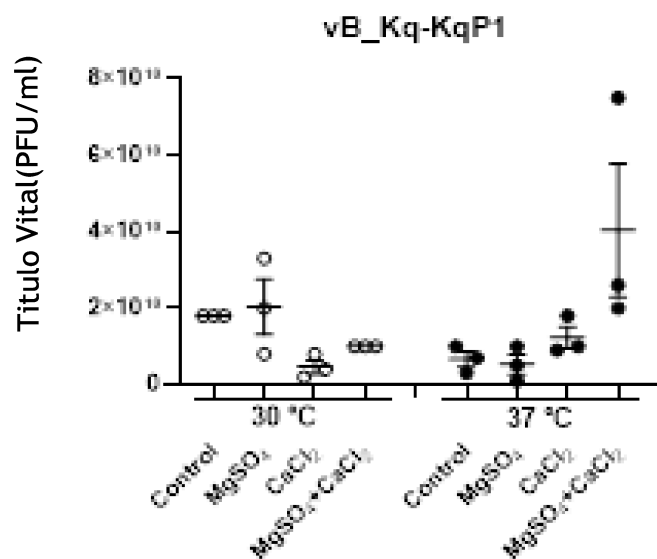


Figura 2: Título viral dos cultivos de quatro bacteriófagos (vB_Kq-KqP1, vB_Kq-KqP3, vB_Kq-KqP4 e vB_Kq-KqP5) de *K. quasipneumoniae* cepa ATCC 700603, na presença de MgSO₄ e/ou CaCl₂ e a 30 °C ou 37 °C. Como controle, foi utilizado o meio LB (sem MgSO₄ ou CaCl₂). Todos os cultivos foram realizados em triplicada e cada círculo, vazio ou preenchido, representa o título viral. Quando não houve multiplicação do fago no cultivo, o respectivo título viral (zero) foi removido do cálculo estatístico. A linha horizontal maior representa a mediana e as linhas menores, o desvio padrão

4. Discussão

Apesar dos estudos que relataram a importância dos íons metálicos na adsorção e replicação dos bacteriófagos (STRATHDEE *et al.*,2023; (HARGREAVES; KROPINSKI; CLOKIE, 2014), os resultados do presente estudo indicam que a adição dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} ao meio não apresentaram influência nos cultivos dos bacteriófagos isolados por nossa equipe.

A ausência de diferença significativa entre as temperaturas de 30 °C e 37 °C para o cultivo dos fagos tem implicações importantes, pois confirma que os bacteriófagos mantêm sua atividade lítica na temperatura corporal humana. Como exemplo, estudos recentes demonstraram que bacteriófagos isolados contra *K. quasipneumoniae* foram capazes de infectar e lisar diferentes cepas dessa bactéria, incluindo cepas resistentes a múltiplos antibióticos. Isso sugere que esses fagos possuem um potencial terapêutico robusto, especialmente no combate a infecções hospitalares associadas a biofilmes e dispositivos médicos (LI, *et al.*,2024). Esses resultados reforçam a viabilidade da fagoterapia como uma abordagem alternativa no enfrentamento de infecções bacterianas complexas (DICKS, VERMEULEN,2024).

A quantidade de fagos a serem utilizados em terapia varia de acordo com o local da infecção bacteriana. Em ensaio clínico com pacientes humanos com otite crônica causada por *Pseudomona aeruginosa*, o tratamento foi realizado com um coquetel contendo seis fagos, administrados na quantidade de 10^5 PFU de cada fago, em dose de 200 μ L, resultando em diminuição significativa na quantidade de bactérias para 56,9%, 17,4% e 23,9% nos dias 7, 21 e 42 do início do tratamento, respectivamente (WRIGHT *et al.*, 2009). Em outro estudo, camundongos foram inoculados intraperitonalmente com *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina. Diferentes quantidades de fagos foram inoculadas da mesma maneira após 45 minutos da inoculação da bactéria e aqueles inoculados com 3×10^8 e 3×10^9 PFUs se recuperaram totalmente, enquanto aqueles que

receberam doses de 3×10^4 e 3×10^6 PFUs, 40% e 60%, respectivamente, se recuperaram (BISWAS et al., 2002).

Ainda que não tenha sido detectada diferença significativa no título viral nas diferentes condições avaliadas, os títulos obtidos para os fagos utilizados estão compatíveis para sua utilização como terapia. Por outro lado, embora os resultados sejam promissores, é necessário considerar que a produção em larga escala de bacteriófagos ainda apresenta desafios técnicos. A padronização da produção e a garantia de estabilidade dos fagos ao longo do tempo são fatores cruciais para que a fagoterapia se torne uma opção viável em contextos clínicos (WRIGHT et al., 2009). Além disso, análises de custo e viabilidade econômica da fagoterapia em grande escala terão um impacto crítico na adoção clínica (FURFARO; PAYNE; CHOONG, 2018).

Por fim, a terapia com fagos combinando diferentes fagos será uma estratégia promissora importante para maximizar a eficácia terapêutica. Essa abordagem pode aumentar a diversidade geral dos fagos disponíveis e melhorar os desfechos clínicos, especialmente em infecções complexas (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014)

Contudo, para que a fagoterapia se torne amplamente adotada, desafios técnicos e regulatórios ainda precisam ser superados. A produção em larga escala de fagos deve ser padronizada, e estudos clínicos em humanos são necessários para garantir a segurança e eficácia dos tratamentos. À medida que a crise da resistência bacteriana se intensifica, a fagoterapia emerge como uma solução promissora e inovadora, capaz de transformar o cenário atual de tratamento de infecções (PIRES *et al.*, 2020).

5. Conclusão

Este estudo avaliou o potencial da fagoterapia para tratar infecções causada por *K. quasipneumoniae* multirresistentes, destacando desafios na produção em larga escala de bacteriófagos. Apesar de as condições de cultivo testadas, como variação de temperatura e adição de sais, não terem demonstrado aumentos significativos nos títulos virais, os resultados sugerem que outros fatores, como características genéticas dos fagos e da cepa hospedeira, podem ser determinantes na replicação viral. Esses achados reforçam a necessidade de mais estudos para compreender os mecanismos que influenciam a eficiência da produção de fagos e a padronização de protocolos. Embora não conclusivos, os resultados confirmam o potencial terapêutico dos bacteriófagos e apontam estratégias futuras, como a combinação de fagos e otimização de processos, para viabilizar sua aplicação clínica em infecções bacterianas resistentes.

7. Referências

- ABEDON, S. T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66–85, 2011.
- CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.
- CLOKIE, M. R. et al. Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2011.
- DAS, S.; KALEDHONKAR, S. Physiochemical characterization of a potential Klebsiella phage MKP-1 and analysis of its application in reducing biofilm formation. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 2024.
- DICKS, L. M. T.; VERMEULEN, W. Bacteriophage-host interactions and the therapeutic potential of bacteriophages. **Viruses**, v. 16, n. , 2024.
- DION, M. B.; OECHSLIN, F.; MOINEAU, S. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125–138, 2020.
- EFFAH, C. Y. et al. Klebsiella pneumoniae: an increasing threat to public health. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1, 2020.
- FURFARO, L. L.; PAYNE, M. S.; CHANG, B. J. Bacteriophage therapy: Clinical trials and regulatory hurdles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 376, 2018.
- GILL, J. J.; HYMAN, P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 2–14, 2010.
- 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.
- GÓRSKI, A. et al. The fall and rise of phage therapy in modern medicine. **Expert opinion on biological therapy**, v. 19, n. 11, p. 1115–1117, 2019.
- HARGREAVES, K. R.; KROPINSKI, A. M.; CLOKIE, M. R. J. What does the talking?: quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85131, 2014.
- HARPER, D. et al. Bacteriophages and biofilms. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 3, p. 270–284, 2014.
- KORTRIGHT, K. E. et al. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 2, p. 219–232, 2019.

LI, J. et al. Ackermannviridae bacteriophage against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* of capsular type 64. **Frontiers in microbiology**, v. 15, p. 1462459, 2024.

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.

OSMAN, A.-H. et al. The potential of bacteriophage-antibiotic combination therapy in treating infections with multidrug-resistant bacteria. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, 2023.

PIRES, D. P. et al. Current challenges and future opportunities of phage therapy. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 6, p. 684–700, 2020.

PRINCIPI, N.; SILVESTRI, E.; ESPOSITO, S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 513, 2019.

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

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G., Jr. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, 001.

TOWNSEND, E. M. et al. Isolation and characterization of *Klebsiella* phages for phage therapy. **PHAGE (New Rochelle, N.Y.)**, v. 2, n. 1, p. 26–42, 2021.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226–235, 2014.

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: official journal of ENT-UK; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery**, v. 34, n. 4, p. 349–357, 2009.