

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARA SILVA REIS

Aplicação da ferramenta *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) na caracterização molecular de bacteriófagos de *Klebsiella* spp.

Uberlândia, MG

2025

LARA SILVA REIS

Aplicação da ferramenta *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) na caracterização molecular de bacteriófagos de *Klebsiella* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Coorientador: Bel. Pedro Antonio Moraes Souza

Uberlândia, MG

2025

LARA SILVA REIS

Aplicação da ferramenta *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) na caracterização molecular de bacteriófagos de *Klebsiella* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Uberlândia, 2025

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa (ICBIM/UFU)

Membro 1: Prof^ª Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges (ICBIM/UFU)

Membro 2: Dra. Mayara Garcia Polli (Usuário Externo)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente Trabalho de Conclusão de Curso segue as normas de submissão da **Revista da Biologia** (ISSN:1984-5154), e as orientações das normas específicas para o Trabalho de Conclusão da Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura ou Bacharelado) do Conselho do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (Campus Umuarama), Resolução CONIB n° 12, de 27 de novembro de 2023.

Tipo de texto: Artigo de Pesquisa

Área: Genética e Biologia Molecular

Título:

Aplicação da ferramenta *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) na caracterização molecular de bacteriófagos de *Klebsiella* spp.

Application of the *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) tool for the molecular characterization of *Klebsiella* spp. phages

Texto de divulgação:

A crescente multirresistência bacteriana aos antimicrobianos traz a urgência do desenvolvimento de métodos terapêuticos alternativos aos antimicrobianos atuais, como a fagoterapia – uso dos bacteriófagos (vírus que infectam bactérias específicas) para o combate de infecções bacterianas. Nesse estudo, foram caracterizados molecularmente dez bacteriófagos isolados previamente de amostras do Rio Aricanduva (São Paulo, Brasil), utilizando cepas de *Klebsiella* spp. como hospedeiras (patógenos frequentemente associados a infecções hospitalares). A análise realizada pela ferramenta RAPD-PCR permitiu a identificação de quatro perfis genéticos distintos, revelando a diversidade molecular entre isolados do mesmo efluente, se fazendo relevante para uso futuro desses bacteriófagos em outros experimentos e análise de seu potencial terapêutico.

Resumo: A fagoterapia, estratégia que utiliza bacteriófagos (vírus altamente específicos para bactérias) para lise de bactérias causadoras de infecção, ganha relevância visto o atual contexto da multirresistência bacteriana aos antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo a caracterização molecular de dez fagos com cepas de *Klebsiella* spp. como hospedeiras, utilizando a RAPD-PCR, para análise da diversidade genética. Após extração do DNA com protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), uso na RAPD-PCR e eletroforese em gel de agarose, foram visualizados diferentes perfis entre os isolados, sugerindo que, dentre os dez fagos, há pelo menos quatro distintos. A RAPD-PCR se mostrou eficaz, embora sejam necessários outros experimentos para melhor caracterização dos isolados e seu potencial uso terapêutico.

Palavra-chave: Técnica RAPD, biologia molecular, bacteriófagos, tipagem molecular, *Klebsiella*.

Abstract: Phage therapy, a strategy that uses bacteriophages (viruses highly specific to bacteria) to lyse infection-causing bacteria, has gained relevance given the current context of bacterial multiresistance to antimicrobials. This study aimed to perform the molecular characterization of ten *Klebsiella* spp. phages, using RAPD-PCR to analyze genetic diversity. After DNA extraction following the protocol described by Sambrook and Russel (2001), RAPD-PCR and agarose gel electrophoresis, distinct profiles among the isolates were revealed, suggesting that at least four different phages were identified. RAPD-PCR proved to be effective, however, further experiments are needed for better characterization of the isolates and evaluation of their therapeutic potential.

Key-words: RAPD technique, molecular biology, phages, molecular typing, *Klebsiella*

1. INTRODUÇÃO

A *Klebsiella pneumoniae*, bactéria presente no intestino humano, faz parte das Enterobacteriaceae, que é a família de bactérias Gram negativas responsáveis por grande parte de infecções ocorrentes em humanos, como infecções do trato urinário, pneumonia, meningite e até mesmo sepse no contexto hospitalar. Nesse clado, existem as *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (CPE), ou seja, resistentes a antimicrobianos carbapenêmicos – considerados de último recurso, utilizados em infecções microbianas gravíssimas– sendo a *K. pneumoniae* uma de suas representantes e apresentando uma alta probabilidade de óbito quando presente no organismo (Nordmann *et al.*, 2011; OPAS, 2022; OMS, 2023). A produção de enzimas β -lactamase é o principal mecanismo de resistência utilizado pelas CPEs, sendo a *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC) uma das enzimas β -lactamase de maior interesse clínico atualmente (Pereira *et al.*, 2003); mesmo existindo registros em outras espécies, a KPC é majoritariamente encontrada na cepa de *K. pneumoniae*, que, por sua alta facilidade de disseminação, tem sido identificada por todo o mundo (Meyer e Picoli, 2011; Pereira *et al.*, 2003). Assim, essa bactéria, considerada a segunda enterobactéria oportunista de maior relevância atual, se torna um grande risco no contexto hospitalar, tanto pela facilidade de transmissão quanto por poder causar diferentes tipos de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos que já estão sendo tratados para outras condições clínicas (Azevedo *et al.*, 2024; Moya e Maicas, 2020;).

A resistência bacteriana a antimicrobianos, em especial a múltiplos antimicrobianos, representa um dos maiores desafios para a saúde pública do século XXI, ocasionando em alto número de óbitos, além dos exorbitantes gastos com pacientes hospitalizados e com a saúde em si (OPAS, 2024). Ela ocorre a partir da junção do mecanismo de seleção natural e a relação patógeno-ambiente, permitindo que os organismos que possuem mais resistência aos antimicrobianos sejam favorecidos e prevalentes (Gato *et al.*, 2022). É estimado que até 2050,

pode-se atingir até 1,91 milhão de mortes diretas e 8,22 milhões de mortes associadas à resistência antimicrobiana (RAM) (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Tendo em vista esse cenário global em relação a RAM, métodos alternativos aos antibacterianos, como a fagoterapia, passam a se tornar uma alternativa.

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus extremamente específicos de bactérias, podendo ser responsáveis por sua morte por lise; estão presentes em abundância em todos os ecossistemas, em particular, em todos os ambientes em que está sua célula hospedeira (Sharma *et al.*, 2016). A fagoterapia, que nada mais é do que a utilização dos fagos virulentos para o tratamento de doenças bacterianas, já era estudada antes da descoberta da penicilina em 1928 por Fleming, e devido a essa descoberta acabou perdendo a intensidade desde então; contudo, a fagoterapia tem voltado à tona como uma alternativa para a urgente situação da não eficácia dos antimicrobianos (Sulakvelidze, 2001).

Desse modo, dez bacteriófagos provenientes do Rio Aricanduva (São Paulo, SP), cinco deles utilizando a *Klebsiella quasipneumoniae* cepa ATCC 600706, considerada multirresistente, e os demais cinco utilizando outra cepa de *Klebsiella* sp. como respectivas bactérias hospedeiras, foram previamente isolados pela equipe, e presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular desses fagos para determinar se são a mesma cepa ou não, uma vez que foram isolados da mesma amostra e seu genoma é desconhecido até o momento. A caracterização molecular se faz necessária para o uso futuro dos bacteriófagos em testes contra bactérias formadoras de biofilme, e seu potencial para o uso terapêutico.

Para a caracterização molecular dos fagos, foi utilizada a ferramenta RAPD-PCR, uma relevante metodologia a ser aplicada na caracterização molecular de bactérias e vírus. Diferentemente da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tradicional, que utiliza *primers* específicos, a RAPD-PCR baseia-se na amplificação de vários segmentos provenientes da mesma amostra de DNA com a utilização de *primers* de sequências curtas, gerando, após a

eletroforese, um perfil de bandas ou *fingerprint* (impressão digital, em tradução literal), sendo considerada um método de tipagem rápida (Williams *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 2011). Devido à sua simplicidade e viabilidade em relação ao custo-benefício, além de não exigir um conhecimento prévio sobre a sequência nucleotídica da espécie estudada, a RAPD-PCR apresenta-se como uma ótima técnica para a rápida caracterização molecular de organismos (Lacerda *et al.*, 2002).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas e fagos isolados

As cepas bacterianas utilizadas para o experimento foram *K. quasipneumoniae* cepa ATCC 700603 e *Klebsiella* sp., denominada *Klebsiella* 2010, de origem desconhecida. Para cada cepa bacteriana, cinco bacteriófagos foram isolados pela equipe a partir de efluentes do Rio Aricanduva, seguindo a nomenclatura: KqP1, KqP2, KqP3, KqP4 e KqP5 (fagos isolados de *Klebsiella quasipneumoniae*) e K2010P1, K2010P2, K2010P3, K2010P4 e K2010P5 (fagos isolados de *Klebsiella* 2010).

Cultivo das bactérias

As bactérias foram cultivadas em meio LB (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl e 2% ágar para placas) contendo MgSO₄ 10mM (LB/MgSO₄), e incubadas a 37 °C *overnight* (O/N). No dia seguinte, para ambas as cepas, uma colônia isolada formada na placa foi coletada, inoculada em 2 mL de LB/MgSO₄ líquido em tubos cônicos de 50 mL e incubada O/N a 37 °C com agitação, finalizando o primeiro inóculo.

Um volume de 100 µL do cultivo O/N de cada bactéria foi inoculado em 5 mL de meio LB/MgSO₄ e a suspensão foi incubada a 37 °C com agitação durante 2 h, caracterizando o segundo inóculo, utilizado para a determinação do título viral.

Cultivo dos bacteriófagos

Um volume de 10 µL do estoque de bacteriófago, juntamente com 100 µL do primeiro inóculo da respectiva bactéria hospedeira, foi adicionado em 5 mL de meio LB/MgSO₄ e a suspensão foi incubada a 37 °C com agitação O/N.

No dia seguinte, foi adicionado um volume de 200 µL de clorofórmio em cada tubo, que, após agitação por 25 min, foi centrifugado por 10 min a 3.800 xg. A fase aquosa de cada suspensão do bacteriófago produzido foi transferida para novos tubos, que foram armazenados a – 20 °C.

Determinação do título viral

Para o controle da qualidade dos bacteriófagos cultivados, foi realizada a determinação do título viral; um volume de 100 µL do segundo inóculo de cada bactéria foi misturado com 900 µL de LB/MgSO₄ e a mistura foi vertida sobre o meio LB/MgSO₄ ágar em placa. Após a suspensão ser espalhada por toda a superfície do meio, seu excesso foi removido e a placa foi deixada aberta até que a superfície do meio estivesse seca. Em seguida, 10 µL das diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁸ dos fagos foram depositados em diferentes divisões da placa (cada bacteriófago na placa com a suspensão de sua respectiva bactéria hospedeira). Após a secagem, a placa foi incubada a 37 °C O/N. Após o período de incubação, as placas de lise individuais foram contadas e o título viral foi determinado, seguindo a fórmula: título viral (PFU/ml) = no. de placas de lise x fator de diluição x 100.

Extração do DNA dos bacteriófagos

A extração de DNA baseou-se no protocolo “Protocol 11: extraction of bacteriophage λ DNA from large-scale cultures using proteinase K and SDS”, descrito por Sambrook & Russell

(2001), com modificações; para cada amostra de bacteriófago, em que foram realizados os seguintes passos:

Um volume de 500 µL da suspensão de bacteriófago, foi adicionado a 55 µL de 10x DNase I Reaction Buffer (10mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,6) e 1 µL de DNase I 2 UI/µL (Sigma) e a mistura foi incubada por 10 min a 37 °C com agitação.

Em seguida, foram adicionados EDTA pH 8,0 para concentração final de 1 mM, proteinase K para 50 µg/mL e SDS para 0,5%. Essa mistura foi submetida à agitação e incubação por 1 h a 56 °C. Após a incubação, foram adicionados 250 µL de fenol tratado com Tris-HCl pH 8,0 e 250 µL de clorofórmio, agitando-se o tubo por inversão. Essa mistura foi centrifugada a 3000 xg por 5 min a 20 °C. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo, seguida da adição de 3 M de NaOAc pH 5,3, em um volume equivalente a 1/10 do volume da amostra, e isopropanol em um volume equivalente a 7/10 do volume da amostra. Após agitação por inversão, os microtubos foram incubados a -20°C O/N.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 11000 xg por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70%. Após secagem (tempo entre cinco e dez min), o *pellet* foi dissolvido com 30 µL de TE modificado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) e as amostras foram incubadas por 15 min a 56 °C. Após o período de incubação, as amostras foram agitadas e estocadas a - 20 °C. Os DNAs extraídos foram quantificados com Qubit (Thermo Fisher).

RAPD-PCR dos DNAs extraídos dos bacteriófagos

Para o procedimento RAPD-PCR, foi utilizado o protocolo descrito por Gutiérrez *et al.* (2011): O *primer* curto utilizado para a reação foi OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3'); A mistura para PCR foi preparada com GoTaq Colorless Master Mix (Promega), seguindo as instruções do fabricante, com algumas adaptações: GoTaq Colorless Master Mix 1x, suplementação com

MgCl₂ 1,5 mM, *primer* OPL5 8 mM e 30 ng de DNA, em volume de reação de 25 µL. Como controle positivo, foi utilizado 30 ng de DNA de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1, e como controle negativo o volume do tubo foi completado com água para biologia molecular.

Tabela 1. Tabela com as condições de reação para RAPD-PCR de DNAs de bacteriófagos

Características gerais	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
5x	94	45
1x	30	120
1x	72	60
30x	94	5
	36	30
	72	30 (+1 a cada ciclo)
1x	75	600

Após a reação de amplificação (Tabela 1), 5 µL de cada amostra foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando TBE 0,5X (Tris base 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, e EDTA 2 mM) e DSview. A amostra da reação foi misturada com 1,5 µL de loading buffer 6x e aplicada ao gel. Como padrão de massa molecular, foi utilizado o GeneRuler 1 Kb Plus (Thermo Fisher). A eletroforese foi realizada em uma condição de aproximadamente 8 V/cm durante 30 min. Após o tempo de corrida, o gel foi fotografado utilizando transiluminador de luz UV e fotodocumentador.

3. RESULTADOS

Por meio da eletroforese em gel de agarose (Figura 1), foram observados quatro perfis de bandas distintos: A) perfis similares formados pelas amostras de KqP1, KqP3, KqP4 e KqP5; B) perfil formado pela amostra de KqP2; C) perfis formados pelas amostras de K2010P1 e K2010P3; D) perfis formados pelas amostras de K2010P2, K2010P4 e K2010P5. Os perfis de bandas variaram de cerca de 400 a cerca de 3000 pares de base, diferindo, além de massa molecular, também pela intensidade das bandas.

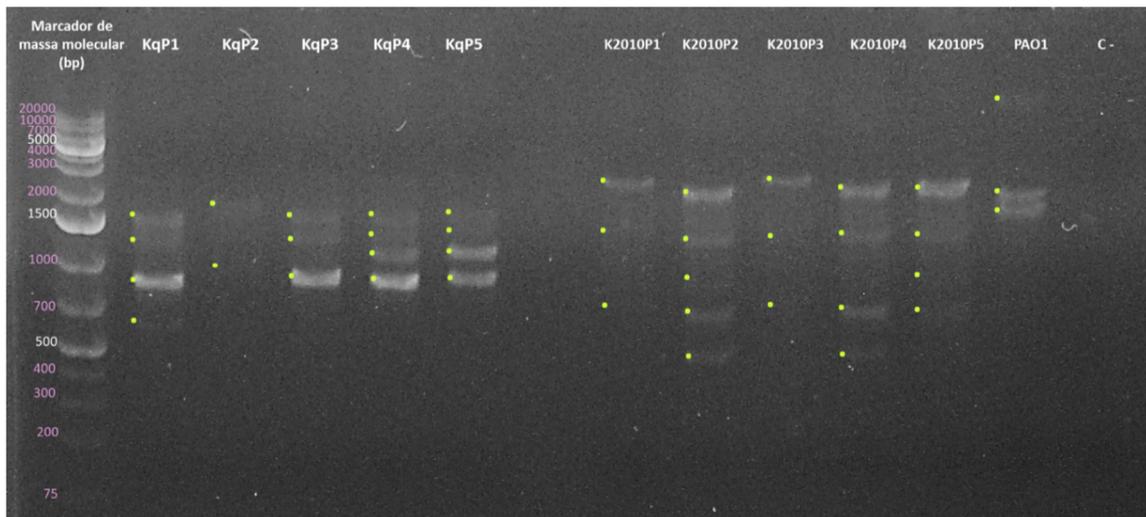


Figura 1. Imagem da eletroforese em gel de agarose com produtos de RAPD-PCR utilizando DNAs de bacteriófagos de *Klebsiella* spp. e o *primer* OPL5. Os pontos coloridos marcam as bandas visíveis. A identificação da amostra está colocada acima de cada poço. Como controle positivo, foi utilizado DNA de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1 e como controle negativo, nenhum DNA foi colocado no tubo.

Dentre as amostras do perfil A, apesar de intensidade de bandas diferentes, KqP4 e KqP5 apresentaram o mesmo perfil de bandas, sugerindo serem provavelmente a mesma cepa de bacteriófago. Além disso, devido à similaridade dos perfis eletroforéticos, estas cepas são próximas a KqP1 e KqP3. Assim, dentre os cinco fagos isolados de *K. quasipneumoniae*, quatro parecem ser cepas diferentes.

Com perfis eletroforéticos idênticos (C), K2010P1 e K2010P3 possivelmente são a mesma cepa. Desta forma, dos cinco fagos isolados de *Klebsiella* 2010, quatro também parecem ser cepas diferentes.

Para o controle positivo do experimento, foi utilizado DNA de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PAO1. Para o controle negativo, o volume do tubo foi completado com água para biologia molecular.

4. DISCUSSÃO

Mesmo se tratando de bacteriófagos isolados oriundos do mesmo efluente, quatro diferentes perfis de bandas foram detectados, dois de cada cepa de *Klebsiella* utilizada como hospedeira, revelando que a maioria dos fagos eram geneticamente diversos, ainda que com suas devidas similaridades. Isso mostra a efetividade da ferramenta RAPD-PCR na determinação de similaridade ou distinção entre os genomas dos bacteriófagos analisados, sem exigir reconhecimento prévio de suas sequências genômicas, corroborando com o descrito em estudos anteriores (Addablah *et al.*, 2021; Gutiérrez *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 1990).

O fago KqP2, do perfil eletroforético B, não apresentou similaridade com nenhum outro fago, sugerindo ser distinto dos demais fagos de *K. quasipneumoniae*, provavelmente de espécie, gênero ou família diferente. Da mesma forma, K2010P1 e K2010P3, de perfil eletroforético C e talvez sejam fagos da mesma cepa, são provavelmente de espécie, gênero ou família diferente de K2010P2, K2010P4 e K2010P5, de perfil eletroforético D.

A presença de fagos com perfis idênticos (KqP4 e KqP5; K2010P1 e K2010P3) sugere que possivelmente seja a mesma cepa do fago. Para uma melhor definição, haveria a necessidade de realizar a RAPD-PCR com outros *primers*.

Diante dos resultados, e tendo em vista estudos anteriores, como Addablah e colaboradores (2021), Williams e colaboradores (1990), e tomando o de Gutiérrez e colaboradores (2011) como principal referência, nota-se que a RAPD-PCR é uma ferramenta adequada e acessível para a determinação da diversidade de fagos. Dos dez fagos isolados, oito se mostraram cepas diferentes, de quatro grupos distintos, revelando a diversidade encontrada em uma mesma amostra obtida do Rio Aricanduva. A caracterização molecular obtida se faz de suma importância para a utilização dos bacteriófagos isolados em futuros experimentos, para a corroboração dos resultados obtidos e para o estudo de seu potencial uso terapêutico em cepas

bacterianas multirresistentes, visto a alta especificidade dos fagos a suas células hospedeiras e a baixa toxicidade, e considerando a urgência do desenvolvimento de novas terapias alternativas aos antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

A técnica RAPD-PCR se mostrou satisfatória para a caracterização molecular de bacteriófagos de *Klebsiella* spp., possibilitando a identificação de padrões de bandas compartilhados entre os fagos isolados com a mesma cepa bacteriana, assim como os padrões distintos dos fagos isolados com as diferentes cepas de *Klebsiella*. Além disso, a ferramenta sugeriu possíveis relações filogenéticas entre os isolados, ainda que sejam necessários outros experimentos para a comprovação.

Os bacteriófagos isolados serão submetidos a microscopia eletrônica de transmissão (MET) para sua caracterização morfológica, e serão testados contra bactérias formadoras de biofilmes e sua efetividade para a terapia antimicrobiana com cepas multirresistentes.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à agência de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica destinada a Lara Silva Reis, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de mestrado destinada a Pedro Antonio Moraes Souza.

Também agradecemos à Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas, do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia, pela cepa de *Klebsiella quasipneumoniae* (ATCC 600706) cedida.

7. REFERÊNCIAS

Addablah AA, Kakou-Ngazon S, Akpa EE, Adioumani E, Ndombi FM, Aoussi S, Dosso M. 2021. RAPD-based evaluation revealed genetically diverse populations of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* lytic bacteriophages isolated in urban sewage and Ebrie Lagoon, Côte d'Ivoire. *African Journal of Microbiology Research*, 15: 522-528.

Azevedo AP, Santos ML, Moura BE. 2024. Perfil de resistência antimicrobiana: resultado da vigilância epidemiológica das infecções relacionadas à assistência à saúde-IRAS de UTI's de um hospital de referência em infectologia de Manaus. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 6: 1123–1137.

Gato PC, Maia AL, Santos KAS, Santos LA, Silva EMR. 2022. Perfil de resistência bacteriana da *Klebsiella pneumoniae* na unidade de terapia intensiva em um hospital de ensino no oeste do Pará no período de 2018 a 2019. *Brazilian Journal of Development*, 7: 115549–115566.

GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. 2024. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404: 1199-1226.

Gutiérrez D, Martín-Platero AM, Rodríguez A, Martínez-Bueno M, García P, Martínez B. 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 322: 90-97.

Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, 3: 87-92.

Meyer G, Picoli SU. 2011. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47:25–31.

Moya C, Maicas S. 2020. Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains: mechanisms and outbreaks. *Proceedings*, 66: 11.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 1791–1798.

Organização Mundial da Saúde (OMS). 2023. Antimicrobial resistance. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 8 mai. 2025.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). 2022. Relatório sinaliza aumento da resistência a antibióticos em infecções bacterianas. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2022-relatorio-sinaliza-aumento-da-resistencia-antibioticos-em-infeccoes-bacterianas>. Acesso em: 9 mar. 2025.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). 2025. Resistência antimicrobiana. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 9 mar. 2025.

Pereira AS, Carmo Filho JR, Tognim MCB, Sader HS. 2003. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39: 301–308.

Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197: 1079-1081.

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2344 pp.

Sharma S, Chatterjee S, Datta S, Prasad R, Dubey D, Prasad RK, Vairale MG. 2016. Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62: 17-55.

Son B, Yun J, Lim J-A, Shin H, Heu S, Ryu S. 2012. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiology*, 12:33.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 649-659.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.