

Pesquisa de substâncias antagonistas tipo bacteriocinas produzidas por amostras de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes isoladas de pacientes internados no Hospital Regional do Município de Barbacena, Minas Gerais

Research of antagonist substances bacteriocins produced by samples of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from patients admitted to Regional Hospital of Barbacena-City, Minas Gerais

Roberta Chaves Araújo¹, Cirlene Dimas Ferreira², Cristina Maria Miranda Bello³

RESUMO

¹Acadêmica do 11º período do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Barbacena, MG
²Técnica em Patologia Clínica da Faculdade de Medicina de Barbacena, MG
³Mestre em Ciências, Professora da Faculdade de Medicina de Barbacena, MG

Objetivos: detectar a produção de bacteriocinas, determinar a suscetibilidade das amostras coletadas a essas substâncias e estabelecer possível correlação entre bacteriocinas e sua ação antimicrobiana. **Métodos:** foram coletadas 14 amostras isoladas de processos infecciosos causados por cepas de *Staphylococcus aureus*/Meticilina resistentes (MRSA), de pacientes do município de Barbacena-MG. Essas amostras foram previamente identificadas, caracterizadas como MRSA, preservadas à temperatura de -80°C em freezer, em meio apropriado de manutenção com crioprotetores, *skim-milke*, e submetidas a testes no laboratório. **Resultados:** foram realizados 196 testes, sendo que 100% das amostras testadas mostraram-se produtoras de bacteriocinas. As cepas MRSA eram, em 71,4% dos casos, sensíveis à ação de bacteriocinas produzidas pelas bactérias testadas, tendo o seu crescimento inibido. O fenômeno de autoantagonismo foi também observado em 57,1% das bactérias estudadas. **Conclusão:** os resultados demonstraram o alto potencial antimicrobiano das MRSA isoladas. O autoantagonismo exerce marcante papel na manutenção do equilíbrio entre as comunidades microbianas que constituem a flora humana normal. Diante do aumento e da rápida disseminação de bactérias patogênicas multirresistentes, encontradas em ambientes hospitalares e na comunidade, as bacteriocinas estudadas poderiam oferecer solução alternativa na terapêutica de infecções envolvendo esses patógenos. **Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; Agentes Antibacterianos; Antimicrobianos; Bacteriocinas.

ABSTRACT

Objectives: To detect the production of bacteriocins, determine the susceptibility of the samples collected for these substances and establish possible correlation between bacteriocin and its antimicrobial action. **Methods:** 14 samples of infectious diseases caused by strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were gotten from patients in the town Barbacena, MG. These samples were previously identified, characterized as MRSA, preserved at -80°C in freezer, in an appropriate medium to be maintained with cryoprotectors, *skim-milk*, and tested in the laboratory. **Results:** in 196 tests that were carried out, 100% of the tested samples produced bacteriocins. The strains were MRSA in 71,4% of cases, sensitive to the action of bacteriocins produced by these bacteria, and its growth was inhibited. The self-antagonism phenomenon was observed in 57,1% of the strains studied. **Conclusion:** These results demonstrated a high anti-microbial potential of the MRSA samples isolated. The self-antagonism plays a significant role in maintaining

Recebido em: 15/09/2008
 Aprovado em: 27/08/2009

Instituição:
 Faculdade de Medicina de Barbacena-Minas Gerais

Endereço para correspondência:
 Rua Bernardo Guimarães, 2.014, apto. 401
 Lourdes, CEP: 30140-082, Belo Horizonte – MG
 Email: roberta1907@hotmail.com

the balance of the microbial community that constitute the normal human flora. Given the increase and rapid spread of these multi-resistant pathogens in hospital environments and in the community, the bacteriocins could be an alternative solution in the therapeutic of infections involving MRSA.

Key words: Staphylococcus aureus; Anti-Bacterial Agents; Bacteriocins.

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus* são cocos gram positivo, imóveis e dispostos em cachos irregulares. Compõem parte da flora normal de hospedeiros humanos e usualmente colonizam pele e mucosa de pessoas saudáveis.¹ O gênero *Staphylococcus* tem pelo menos 30 espécies, sendo de importância clínica as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Os *S. aureus* se destacam por serem os principais patógenos que colonizam pessoas saudáveis na comunidade e por participarem de infecções em pacientes hospitalizados.²

Os produtos antagonistas microbianos são constituídos por grande variedade de inibidores, entre os quais estão os antibióticos “clássicos” de baixo peso molecular, enzimas, bacteriófagos e bacteriocinas. As bacteriocinas apresentam na atualidade importante repercussão no meio científico. Há indícios de que a bacteriocinogenicidade possa relacionar-se à virulência de alguns microrganismos e ser responsável por importante vantagem competitiva em situações de colonização e agressão.³

O achado de amostras de MRSA em casos clínicos graves é cada vez mais frequente em todo o mundo, situação preocupante que tem contribuído para a busca de novas drogas antimicrobianas e para a instauração de linhas de pesquisa que visem a compreender melhor o mecanismo de agressão do *S. aureus* ao hospedeiro humano.

Este trabalho objetiva o estudo da produção de bacteriocinas por amostras de MRSA e sua correlação com a ação antimicrobiana.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Barbacena-MG no ano de 2007. Foram coletadas 14 amostras isoladas de processos infecciosos causados por cepas de MRSA, de pacientes assistidos no Hospital Regional do município de Barbacena nesse período. Os pes-

quisadores não tiveram acesso a informações sobre a origem dessas amostras, nem sobre a causa da internação do paciente. O interesse foi verificar a capacidade dessas bactérias em produzir substâncias antagonistas tipo bacteriocinas e a sua ação antimicrobiana. O Comitê de Ética ao qual a pesquisa foi submetida julgou não ser necessária a sua avaliação, em decorrência do não-envolvimento do paciente nesse processo.

As amostras foram previamente identificadas, caracterizadas como MRSA pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional de Barbacena-MG e transportadas ao Laboratório da Faculdade de Medicina de Barbacena. Elas foram preservadas à temperatura de -80°C em freezer, em meio apropriado de manutenção com crioprotetores, *skim-milke*, e submetidas a testes em que foram avaliadas a produção de bacteriocinas e a determinação da suscetibilidade a essas substâncias.^{3,4}

A metodologia utilizada para detectar a atividade bacteriocinogênica foi o método da camada dupla, segundo Farias *et al*.⁵

Foi realizada a inoculação de cada uma das 14 amostras de MRSA no centro de 14 placas de hipertônico manitol, denominadas amostras produtoras, e em 14 tubos contendo tioglicolato, denominadas amostras reveladoras, num total de 196 placas e 196 tubos. As culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas e, a seguir, submetidas à ação do clorofórmio por 20 minutos, quando as placas foram entreabertas por mais 20 minutos para que evaporasse o clorofórmio. A função do clorofórmio era eliminar os microrganismos presentes, deixando apenas a substância de interesse, a bacteriocina, caso tivesse sido produzida. Essas culturas foram, em seguida, recobertas com ágar tioglicolato contendo um inóculo da amostra reveladora. Após incubação a 37°C por 24-48 horas, as placas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de halos de inibição do crescimento da bactéria reveladora. A existência desse halo significava que a bacteriocina sintetizada pela amostra produtora, a que foi inoculada na placa, inibiu o crescimento da amostra reveladora, aquela inoculada no tubo e vertida sobre a placa. Cada amostra isolada foi testada para a produção de substâncias do tipo bacteriocinas contra todas as demais isoladas, inclusive contra elas mesmas.^{3,4}

RESULTADOS

Foram realizados 196 testes, sendo que 100% das amostras mostraram-se produtoras de bacteriocinas. Observou-se que 71,4% das amostras de MRSA estuda-

das eram sensíveis à ação das substâncias antagonistas produzidas pelas amostras avaliadas, tendo o seu crescimento inibido. Foi também registrado o fenômeno de autoantagonismo em 57,1% das bactérias estudadas.

A Tabela 1 descreve os resultados obtidos quanto à sensibilidade das bactérias reveladoras às bacteriocinas sintetizadas pelas amostras produtoras, dispostas na vertical. A palavra sim indica que a substância antagonista produzida pela amostra indicada na vertical inibiu o crescimento das amostras numeradas na horizontal, consideradas sensíveis a essa substância. Em verde, destaca-se o fenômeno do autoantagonismo em que as MRSA's produzem bacteriocinas que, além de inibirem o crescimento de outras bactérias, atuam inibindo o seu próprio crescimento.

Na Figura 1 destacam-se as amostras três e 14, cujas bacteriocinas apresentaram o maior espectro de ação ao inibir 100% das bactérias estudadas. O cruzamento dos resultados do gráfico e da tabela permite identificar que as amostras de maior espectro de ação (1,2,3,4,5,6,13,14) também foram as que apresentaram o autoantagonismo destacado de verde na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A grande variedade de fatores de virulência produzida pelo *Staphylococcus aureus*, associados à sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos, a tem tornado um dos microrganismos responsáveis por altas taxas de

morbidade e de mortalidade em hospitais. No Brasil, *S. aureus* é o microrganismo mais comumente isolado de infecções hospitalares⁵ e, atualmente, tem sido frequente seu achado em infecções adquiridas na comunidade.⁶

As bacteriocinas representam um dos sistemas menos estudados de defesa microbiana. Enquanto não se conhece muito sobre as suas relações evolutivas e seu papel ecológico, fica claro que a sua abundância e diversidade indiquem serem arsenais de eleição microbiana.⁷

Os microrganismos produtores dessas substâncias antagonistas são, em geral, imunes à suas próprias bacteriocinas, devido ao mecanismo de auto-proteção, que é específico da bactéria produtora.^{8,9} O fenômeno do autoantagonismo pode também ocorrer, sendo observado em 57,1% das bactérias avaliadas neste estudo. O autoantagonismo pode relacionar-se ao autocontrole da população da microflora de determinado sítio colonizado nesse organismo. Isso reflete na manutenção do equilíbrio dessa população e, conseqüentemente, no bem-estar e saúde do hospedeiro humano. É evidente, a partir dos dados expostos, que fatores de virulência, como bacteriocinas, têm potencial antimicrobiano com espectro considerável sobre patógenos importantes como MRSA.

Estudos mais aprofundados dessas substâncias colocam as bacteriocinas como novas alternativas para, na prática médica, serem utilizadas como possibilidade terapêutica no controle de processos infecciosos.

Tabela 1 - Relação entre amostras produtoras de bacteriocinas e amostras sensíveis a esta substância

Amostras Produtoras	Amostras Sensíveis													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim		sim			sim		sim
2	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim		sim	sim	sim		sim	sim
3	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
4	sim	sim	sim	sim	sim	sim			sim		sim	sim		sim
5	sim	sim	sim	sim	sim	sim		sim	sim	sim		sim	sim	
6	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim		sim		sim	sim	sim	sim
7		sim			sim	sim					sim		sim	sim
8	sim	sim					sim					sim	sim	sim
9	sim			sim			sim	sim		sim	sim	sim	sim	
10	sim				sim	sim	sim				sim		sim	sim
11	sim			sim		sim	sim	sim	sim			sim	sim	
12	sim		sim				sim	sim	sim	sim	sim		sim	sim
13	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim		sim	sim	sim	sim	sim	sim
14	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim

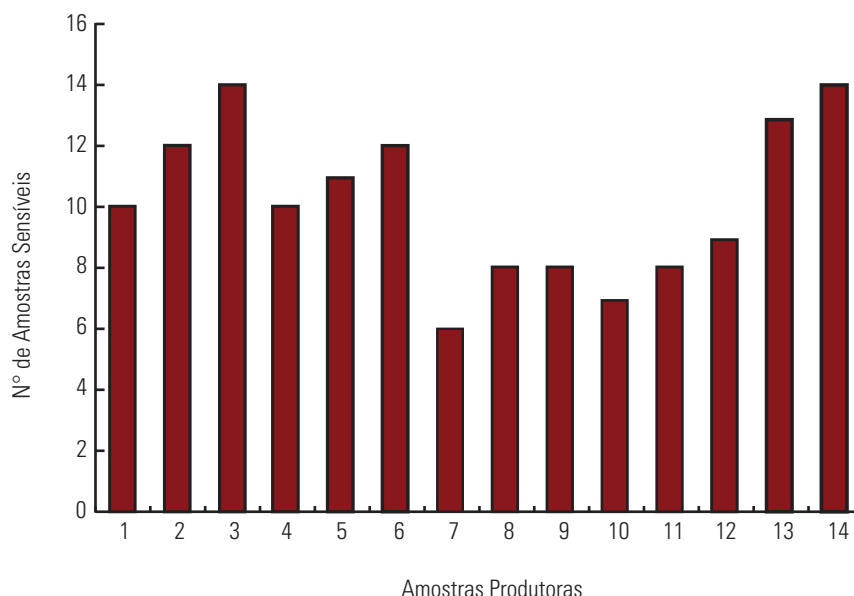


Figura 1 - Espectro de ação das bacteriocinas sintetizadas pelas amostras produtoras.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o elevado potencial antimicrobiano das MRSA isoladas. O auto-antagonismo exerce marcante papel na manutenção do equilíbrio entre as comunidades microbianas que constituem a flora normal humana. Diante do aumento e da disseminação rápida de bactérias patogênicas multirresistentes, encontradas em ambientes hospitalares e na comunidade, as bacteriocinas estudadas poderiam oferecer solução alternativa na terapêutica das infecções envolvendo esses patógenos.

REFERÊNCIAS

1. Ballows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington: American Society of Microbiology;1991.1364 p
2. Cavalcanti SMM, França ER, Vilela MA, Montenegro F, Cabral C, Medeiros ACR. Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* imported to intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil. Rev Bras Epidemiol. 2006; 9(4):436-46.
3. Farias LM, Carvalho MAR, Damasceno CAV, Cisalpino EO, Vieira EC. Bacteriocin like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. Rev Microbiol. 1992;143:51.
4. Miranda CMS, Carvalho MAR, Tavares. Pesquisa, Extração, Caracterização e Purificação Parcial de Substâncias Tipo Bacteriocinas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Isoladas de Calitriquídeos. Belo Horizonte: UFMG; 1993.
5. Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, Mamizuka EM. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. Braz J Infect Dis. 2001; 5(4):163-70.
6. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. Rev Panam Infectol. 2005; 7(3):34-6.
7. Rojas JM. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Cidade do México: Universidade Autónoma de México; 1996.
8. Sahl HG, Bierbaum G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. Ann Rev Microbiol. 1998; 52:41-79.
9. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Lett. 2000; 24:85-106.