



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**POTENCIAL DA NISINA NO CONTROLE DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE (MRSA) E  
SENSÍVEL (MSSA) À METICILINA**

**CÉSAR MATOS RIBEIRO DA SILVA**

**São Cristóvão  
2018**

**CÉSAR MATOS RIBEIRO DA SILVA**

**POTENCIAL DA NISINA NO CONTROLE DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE (MRSA) E  
SENSÍVEL (MSSA) À METICILINA**

Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Sergipe, no curso de Pós-Graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de mestre.

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Andrea Teixeira Barbosa

CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina Pires Carneiro

**São Cristóvão  
2018**

Dedico este trabalho a todos aqueles  
que contribuíram para a sua  
realização.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de começar agradecendo a **Deus** pelas pessoas maravilhosas que recebi nesta vida e que tem me ajudado a evoluir e a me tornar um alguém melhor.

Aos meus pais **Jorge** e **Rose**, meu muito obrigado. Sempre me apoiaram nas minhas decisões, sempre me ensinaram e me deram a melhor educação. Por todo suporte que recebi durante toda a minha jornada e pelo esforço e investimento no meu futuro. Sem eles não seria metade do que sou hoje. Muito Obrigado.

A **Ciro** meu melhor amigo, companheiro, aliado, aquele que teve uma grande importância em uma fase crucial da minha vida. Obrigado por todo cuidado e atenção que me dá. Graças a sua atenção, compreensão, conselhos, apoio e principalmente muita paciência pra aturar meu temperamento nos momentos de descontrole enquanto me descabelava nas pesquisas, eu consegui seguir em frente um tanto mais sereno.

A minha linda filhota de quatro patas, **Abigail**. Que logo no início do mestrado entrou em minha vida pra me ensinar valores que antes eu não conhecia. Sempre esteve ao meu lado mesmo que as vezes tentasse desviar minha atenção, quando pulava em meu colo pedindo carinho. Nunca imaginei o quanto um Beagle pudesse ser tão terrorista, mas você me ensinou a ser paciente. Pai te ama.

As irmãs de coração **Lycia**, **Suzy**, **Karol** e as 'migas' mais próximas, **Tato**, **Txukinha**, **TX**, **Gui** e demais trupes. Mesmo ausente em alguns momentos vocês foram compreensíveis e me desejaram boas vibrações.

Ao pessoal do **FitDance** da academia **Medida Certa**, em destaque as lindas **Paty** e **Dalila** que não poderiam faltar, pois eram essas aulas que me aliviavam do estresse do dia a dia. Donas das melhores sarradas no ar.

A melhor personal **Bruninha** pelo carinho, atenção e cuidado com meu corpo o qual é uma peça importante pra se manter um equilíbrio e sem a qual provavelmente não teria pique pra aguentar as logas caminhas entre um laboratório e outro.

Aos meus **avós** que mesmo estando longe me mandaram vibrações positivas. Aos meus **tios** e **primos** que torceram por mim durante todo esse processo. Obrigado pela força, família **Matos** e **Ribeiro**.

A minha orientadora mais paciente e maravilhosa que pude ter, **Dr<sup>a</sup> Ana Andrea**. Desde o início teve toda atenção em me ensinar coisas novas e me passar todo o conteúdo da melhor forma possível. Escolhi a área pois tinha bastante afinidade com a Microbiologia e graças a você adicionei bastante conhecimento na minha bagagem. Ô professora arretada, quando eu achava que não existia mais nada pra se entender, sobre determinado assunto, ela

vinha com mais e mais informações extras. Uma verdadeira inspiração que definitivamente irei me espelhar pra ser um bom profissional. Meu muito Obrigado.

A minha co-orientadora **Dr<sup>a</sup> Regina** pelas dicas passadas durante este período e pelos momentos em que me proporcionou algumas noites mal dormidas pensando nos procedimentos a serem realizados, mesmo desta forma me passou uma lição valiosa de como saber lidar com determinadas situações, que ocasionalmente podem ocorrer em nossa jornada, e que nos cobra atitudes firmes, para se obter o melhor desfecho.

Ao coordenador **Dr. Silvio Dolabella** que desde as aulas iniciais já me preparava da melhor forma para situações que ainda viriam pela frente. Toda a correria para preparar os seminários valeu a pena, eu e minha dupla fomos sorteados, ao todo, seis vezes. Foi muita quebração de cabeça, mas no fim deu tudo certo. Também sempre se manteve disposto a ajudar no que fosse necessário e pro que precisasse. Que a força esteja com você professor.

Aos meus migos lindos de mestrado, principalmente ao trio maravilha: **Carol, Damião e Genivaldo**. Vocês foram as melhores companhias que eu pude ter durante todo o processo e que quero levar para além disso. Obrigado Carol dos Caramujos, Damião da Dengue e Genivaldo dos Ratos.

As minhas pibiquetes ma-ra-vi-lho-sas por todo apoio prestado e por serem fantásticas enquanto estiveram ao meu lado me auxiliando e passando os perrengues ali juntinhas comigo. Sucesso a vocês **Waleska, Jucy e Jess**.

A todos os alunos, professores e funcionários do **Departamento de Morfologia** em especial a **Marta e Carlos** que me ajudaram bastante quando eu chegava la cheio de material pra autoclavar, até mesmo fora de hora, e que também me acolheram de forma carinhosa. A professora **Dr<sup>a</sup> Sona** por me ensinar que a Biologia Molecular é fantástica. A **Hyrla** que ali no fim do segundo tempo se tornou uma grande aliada nos procedimentos dentro do **LABAC**. E a todos aqueles que mesmo não tão próximos foram solícitos e atenciosos quando cruzaram o meu caminho.

Agradeço, também, à **FAPITEC** pelo apoio financeiro sem o qual não teria nem como ter terminado ou sequer iniciado o mestrado.

Finalmente, gostaria de agradecer à **Universidade Federal de Sergipe**, ao **Departamento de Morfologia** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária** por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha dissertação de mestrado. Proporcionaram-me os melhores momentos durante a minha busca do conhecimento científico com o intuito de levar mais informação a comunidade científica.

Essa conquista é nossa. Obrigado a todos.

Faça ou não faça, tentativa não há.

(Mestre Yoda)

## Potencial da nisina no controle de *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) e sensível (MSSA) à meticilina

### RESUMO

*Staphylococcus aureus* têm sido considerado um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial devido, principalmente, a habilidade de desenvolver resistência a antibióticos. A prevalência de linhagens de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) tanto em ambiente hospitalar quanto em ambientes comunitários têm aumentado, sendo descritos casos de infecções e relatos de mortes em crianças e adultos saudáveis. Bacteriocinas tem sido apontadas como alternativas promissoras para o controle deste patógeno. Entretanto, além do uso terapêutico destes peptídeos ainda não ser aprovado, alguns estudos indicam a possibilidade de seleção de linhagens resistentes. Portanto, antes do uso terapêutico de bacteriocinas, estudos precisam ser realizados para o entendimento do efeito que a bacteriocina possa ter na seleção de linhagens resistentes para evitar o problema da atualidade com linhagens resistentes aos antibióticos tradicionais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana da nisina contra cepas de MRSA e MSSA isoladas da orofaringe de profissionais da área de saúde e verificar a seleção de linhagens resistentes à bacteriocina. Para a caracterização genotípica das linhagens MRSA e MSSA, foram testados os genes *nucA*, *LuckPV*, *mecA* e *mecC*. As linhagens MSSA foram positivas para amplificação apenas do gene *nucA*, confirmando a identificação de gênero e espécie destas linhagens. Para as linhagens MRSA, o único gene que não foi detectado foi o *meC*, confirmando o fenótipo de resistência a meticilina e que estas linhagens são de origem humana e de ambientes comunitários. Os resultados obtidos pelo teste de difusão em ágar demonstraram que 80% das linhagens MSSA (n=30) foram inibidas pela nisina e apenas uma linhagem MRSA (n=6) não apresentou sensibilidade à bacteriocina. A CIM das linhagens de MSSA variou de 97,7 a 1250UI/mL e das linhagens MRSA de 937,50 a 5000 UI/mL. A DBM para as linhagens de MSSA variou de 97,7 UI/mL a valores superiores a 50000 UI/mL, e para MRSA esta variação ficou entre 5000 UI/mL a valores maiores que 10000 UI/mL dependendo da linhagem. Para a maioria das linhagens a DBM foi maior que a CIM, mostrando que o efeito da bacteriocina depende da concentração da mesma: baixas concentrações exercem efeito bacteriostático e altas concentrações efeito bactericida. A adição de concentrações crescentes da bacteriocina ao meio BHI resultaram, de maneira geral, no aumento da fase lag e diminuição da velocidade específica de crescimento e DO máxima atingida pelas culturas MSSA e MRSA. Linhagens de MSSA e MRSA foram transferidas por aproximadamente 30 gerações na presença da bacteriocina e foi observada diminuição na sensibilidade com consequente aumento da CIM da nisina para todas as linhagens testadas. O fenótipo de resistência à bacteriocina demonstrou ser uma característica estável para estas linhagens, podendo estar associado a um fator genético. Foi observado também que a utilização da nisina pode desencadear resistência cruzada a alguns antibióticos. Os resultados obtidos demonstraram que a nisina é eficiente em controlar o crescimento de MSSA e MRSA. Entretanto, o fato destas linhagens demonstrarem resistência a bacteriocina após transferência na presença da mesma indica a necessidade de desenvolver estratégias para evitar no futuro o problema atual de resistência a antibióticos. A melhor maneira de usar bacteriocinas terapêuticamente sugere-se que seja em combinação com antibióticos tradicionais.

**Palavras-chave:** Bacteriocinas. Alternativa terapêutica. Resistência. Orofaringe.

## **Potential of nisin in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA)**

### **ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* has been considered a major public health problem worldwide due mainly to the ability to develop resistance to antibiotics. The prevalence of methicillin resistant strains of *S. aureus* (MRSA) in both hospital and community settings has been increasing, with cases of infections and deaths reported in healthy children and adults. Bacteriocins have been identified as promising alternatives for the control of this pathogen. However, besides the therapeutic use of these peptides still not approved, some studies indicate the possibility of selection of resistant strains. Therefore, prior to the therapeutic use of bacteriocins, studies must be carried out to understand the effect that bacteriocin may have on the selection of resistant strains to avoid the current problem with lineages resistant to traditional antibiotics. In view of the above, the objective of this study was to verify the antimicrobial activity of nisin against strains of MRSA and MSSA isolated from the oropharynx of health professionals and verify the selection of strains resistant to bacteriocin. For the genotypic characterization of the MRSA and MSSA strains, the *nucA*, *LucpV*, *mecA* and *mecC* genes were tested. The MSSA lines were positive for amplification of the *nucA* gene only, confirming the identification of genus and species of these strains. For MRSA strains, the only gene that was not detected was *mecC*, confirming the methicillin resistance phenotype and that these strains are of human origin and of community environments. The results obtained by the agar diffusion test demonstrated that 80% of the MSSA strains (n = 30) were inhibited by nisin and only one MRSA line (n = 6) showed no sensitivity to bacteriocin. The MIC of MSSA strains ranged from 97.7 to 1250 IU / mL and from MRSA strains of 937.50 to 5000 IU / mL. The DBM for MSSA strains varied from 97.7 IU / mL to values greater than 50,000 IU / mL, and for MRSA, this variation was between 5000 IU / mL at values greater than 10,000 IU / mL depending on the lineage. For most lineages DBM was higher than MIC, showing that the effect of bacteriocin depends on bacteriocin concentration: low concentrations exert bacteriostatic effect and high concentrations bactericidal effect. The addition of increasing concentrations of the bacteriocin to the BHI medium generally resulted in the increase in the lag phase and decrease in the specific growth rate and maximal DO reached by the MSSA and MRSA cultures. MSSA and MRSA strains were transferred for approximately 30 generations in the presence of bacteriocin and a decrease in sensitivity was observed with a consequent increase in nisin MIC for all strains tested. The bacteriocin resistance phenotype has been shown to be a stable trait for these strains and may be associated with a genetic factor. It has also been observed that the use of nisin may trigger cross-resistance to some antibiotics. The results obtained demonstrated that nisin is efficient in controlling the growth of MSSA and MRSA. However, the fact that these lines demonstrate resistance to bacteriocin after transfer in the presence of the same indicates the need to develop strategies to avoid in the future the current problem of resistance to antibiotics. The best way to use bacteriocins therapeutically is to suggest that it is in combination with traditional antibiotics.

**Keywords:** Bacteriocins. Therapeutic alternative. Resistance. Oropharynx.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Produto de amplificação do gene *nucA* em linhagens de MSSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. **17**
- Figura 2:** Produto de amplificação do gene *nucA* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. **18**
- Figura 3:** Produto de amplificação do gene *luckPV* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. **19**
- Figura 4:** Produto de amplificação dos genes *mecA* e *mecC* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. **20**

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> utilizados para a caracterização genotípica de MRSA e MSSA   | 13 |
| <b>Tabela 2:</b> Padrões para teste de sensibilidade usando difusão em disco segundo CLSI (2017)   | 16 |
| <b>Tabela 3:</b> Espectro de atividade da nisina contra MSSA. São apresentados presença (+) ou não (-) de halo de inibição e valores de concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina para MSSA   | 21 |
| <b>Tabela 4:</b> Espectro de atividade da nisina contra MRSA. São apresentados presença (+) ou não (-) de halo de inibição e valores de concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina para MRSA   | 22 |
| <b>Tabela 5:</b> Efeito da nisina nos parâmetros de crescimento de linhagens MSSA  | 24 |
| <b>Tabela 6:</b> Efeito da nisina nos parâmetros de crescimento de linhagens MRSA  | 25 |
| <b>Tabela 7:</b> Efeito da nisina na seleção de linhagens de MSSA resistentes a bacteriocina. As linhagens foram transferidas sucessivamente na presença de dose subletal da bacteriocina e a atividade em unidades arbitrárias (UA) foi determinada. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 2)                            | 27 |
| <b>Tabela 8:</b> Efeito da nisina na seleção de linhagens de MRSA resistentes a bacteriocina. As linhagens foram transferidas sucessivamente na presença de dose subletal da bacteriocina e a atividade em unidades arbitrárias (UA) foi determinada. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 2)                            | 28 |
| <b>Tabela 9:</b> Estabilidade do fenótipo de resistência a nisina por MSSA. Linhagens de MSSA resistentes a bacteriocina foram transferidas sucessivamente na ausência da nisina e a atividade em unidades arbitrárias/mL (UA/mL) foi testada após a 0, 10 e 20ª transferência. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 3)  | 29 |
| <b>Tabela 10:</b> Estabilidade do fenótipo de resistência a nisina por MRSA. Linhagens de MRSA resistentes a bacteriocina foram transferidas sucessivamente na ausência da nisina e a atividade em unidades arbitrárias/mL (UA/mL) foi testada após a 0, 10 e 20ª transferência. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 3) | 30 |
| <b>Tabela 11:</b> Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de MSSA, antes da transferência na presença da nisina (S1), após a transferência na presença da nisina (S2) e após transferência na ausência (S3). O resultado é   | 33 |

apresentado em milímetros de halo de inibição

**Tabela 12:** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de MRSA, antes da transferência na presença da nisina (S1), após a transferência na presença da nisina (S2) e após transferência na ausência (S3). O resultado é apresentado em milímetros de halo de inibição

34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |   |
|----------|---|
| ATCC     | American Type Culture Collection  |
| BHI      | Brain Heart Infusion  |
| CA-MRSA  | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina associado a comunidade                                       |
| CDC      | Center for Diseases Control   |
| CFO      | Cefoxitina  |
| CLSI     | Clinical and Laboratory Standards Institute   |
| CIM      | Concentração Inibitória Mínima  |
| CIM2     | Concentração Inibitória Mínima após transferência na presença da nisina   |
| CIM3     | Concentração Inibitória Mínima após transferência das linhagens resistentes a nisina na ausência da bacteriocina. |
| DBM      | Dose Bactericida Mínima   |
| DO       | Densidade Óptica  |
| DNA      | Ácido Desoxirribonucleico   |
| FDA      | Food and Drug Administration  |
| HA-MRSA  | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina associado a infecção hospitalar                              |
| LN       | Logaritmo Neperiano   |
| luckS-PV | Gene cromossômico que codifica a toxina PVL   |
| luckF-PV | Gene cromossômico que codifica a toxina PVL   |
| mecA     | Gene cromossômico de resistência a antibióticos betalactâmicos (humano)   |
| mecC     | Gene cromossômico de resistência a antibióticos betalactâmicos (animal)   |
| MH       | Muller Hinton   |
| mprF     | Fator de resistência de múltiplo peptídeo   |
| MRSA     | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina  |
| MSSA     | <i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina  |
| nsaS     | Nisin susceptibility-associated sensor  |
| NHSN     | National Healthcare Safety Network  |
| PCR      | Reação em cadeia de polimerase  |
| PPB2a    | Proteína ligadora de penicilina   |
| PPBs     | Proteínas de ligação à penicilina   |
| PVL      | Toxicina Panton Valentin Leucocidina  |
| SCCmec   | Cassete cromossômico de <i>Staphylococcus</i>   |
| TCS      | Two-component system  |

|     |  |
|-----|--|
| UI  | Unidades Internacionais                      |
| UA  | Unidades Arbitrárias                         |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias              |
| VRE | <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| kDa     | Kilodalton                   |
| HCl     | Ácido Clorídrico             |
| mg      | Miligrama                    |
| %       | Percentual                   |
| mm      | Milimetro                    |
| mL      | Mililitro                    |
| h       | Hora/Horas                   |
| $\mu$   | Taxa de crescimento          |
| [ ]     | Concentração                 |
| $R^2$   | Coefficiente de determinação |
| $\mu$ l | Microlitro                   |
| nm      | Nanômetro                    |
| $\mu$ m | Micrometro                   |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO</b>  | <b>06</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>07</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | <b>08</b> |
| <b>LISTAS DE TABELAS</b>   | <b>09</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>  | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>   | <b>13</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>  | <b>17</b> |
| 2.1. Bacteriocinas   | 17        |
| 2.2. Uso terapêutico de bacteriocinas  | 18        |
| 2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina (MRSA)   | 21        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | <b>25</b> |
| 3.1. Objetivos gerais  | 25        |
| 3.2. Objetivos específicos   | 25        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>26</b> |
| 4.1. Microrganismos e condições de cultivo   | 26        |
| 4.2. Caracterização genotípica de linhagens MRSA e MSSA  | 26        |
| 4.3. Preparo da nisina e espectro da atividade contra MRSA e MSSA  | 27        |
| 4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina contra MRSA e MSSA | 28        |
| 4.5. Efeito da nisina no crescimento de MRSA e MSSA  | 28        |
| 4.6. Seleção de Linhagens de MRSA e MSSA resistentes à nisina  | 29        |
| 4.7. Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de linhagens sensíveis e resistentes a bacteriocina          | 29        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>31</b> |
| 5.1. Caracterização genotípica de linhagens de MRSA e MSSA   | 31        |
| 5.2. Espectro de atividade da nisina contra MRSA e MSSA  | 34        |
| 5.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina contra MRSA e MSSA | 36        |
| 5.4. Efeito da nisina no crescimento de MRSA e MSSA  | 37        |
| 5.5. Seleção de linhagens de MRSA e MSSA resistentes a nisina  | 40        |
| 5.6. Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de linhagens sensíveis e resistentes a bacteriocina          | 45        |
| <b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>   | <b>50</b> |
| <b>REFERENCIAS</b>   | <b>51</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial é a seleção de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos. O aumento da incidência de patógenos resistentes tem sido relacionado como uma das principais causas de infecções hospitalares, contribuindo para uma elevada taxa de mortalidade (SAHA *et al.*, 2017; BAUER & SAMPATHKUMAR, 2017). Entre os patógenos resistentes, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), Enterococos resistente à vancomicina (VRE) e algumas bactérias Gram-negativo como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, tem sido relatados como os principais responsáveis por atingir as Unidades de Tratamento Intensivo (GUILLAMET & KOLLEF, 2017).

Dentre esses, MRSA tem sido associado tanto a infecções hospitalares (HA-MRSA) quanto a infecções adquiridas em ambientes comunitários (CA-MRSA), sendo o surgimento de cepas de CA-MRSA responsáveis por uma alteração na epidemiologia desta bactéria (NG *et al.*, 2017; SAN *et al.*; 2017). As cepas HA-MRSA são caracterizadas por exibir uma resistência a múltiplas drogas dificultando a seleção de antibióticos no tratamento de pacientes hospitalizados (BHAT *et al.*, 2016). E há ainda o surgimento de um terceiro tipo chamado de LA-MRSA, que tem surgido devido ao aumento da incidência de infecções por MRSA em animais (PAPADOPOULUS *et al.*, 2018). Estudos ainda apontam que a prevalência de MRSA em ambientes comunitários (CA-MRSA) está aumentando substancialmente, chegando a ultrapassar os casos adquiridos em hospitais (HADLER *et al.*, 2012; JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2017). Linhagens de MRSA tem sido isoladas de animais, alimentos e humanos (CASTRO *et al.*, 2017; KINROSS *et al.*, 2017).

O aumento na prevalência de patógenos resistentes a antibióticos implica na existência cada vez menor de agentes antimicrobianos efetivos para tratar infecções causadas por estas bactérias (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; LIN *et al.*; 2016). Essa ocorrência é agravada pelo fato de que há muitas décadas, nenhum agente antimicrobiano novo é desenvolvido e a estimativa é que daqui a 50 anos não existirá nenhum antibiótico eficaz se novas drogas não forem desenvolvidas (ALLEN *et al.*, 2014; ROLAIN *et al.*, 2016; REX & OUTERSON, 2016; HAGRAS *et al.*, 2018). Tal fato gera a necessidade urgente do desenvolvimento de formas alternativas para o controle de patógenos resistentes aos antibióticos tradicionais.

O uso de bacteriocinas tem sido apontado como uma alternativa promissora para o controle de patógenos resistentes a antibióticos (ALLEN *et al.*, 2014; ROLAIN *et al.*, 2016). Bacteriocinas podem ser definidas como peptídeos antimicrobianos produzidos tanto por bactérias Gram-negativo quanto por Gram-positivo, com espectro de ação variado (KARPINSKI & SZKARADKIEWICZ, 2013; REX & OUTTERSON, 2016; OVCHINNIKOV *et al.*, 2017).

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas têm demonstrado ampla aplicação na conservação de alimentos (TOLDI *et al.*, 2014; OGAKI *et al.*, 2015; AHMAD *et al.*, 2017), mas estudos também têm mostrado seu potencial terapêutico (BALCIUNAS *et al.*, 2013; ALLEN *et al.*, 2014; BEHRENS *et al.*, 2017). A nisina, umas das bacteriocinas mais estudadas e melhor caracterizada pode ser utilizada concomitantemente ao antibiótico diminuindo, assim, as chances de seleção de linhagens resistentes (KARPINSKI & SZKARADKIEWICZ, 2013; OVCHINNIKOV *et al.*, 2017; JORGE *et al.*, 2017). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana da nisina contra cepas de MRSA e MSSA isoladas da orofaringe de profissionais da área de saúde e verificar a seleção de linhagens resistentes à bacteriocina.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Bacteriocinas

Historicamente o termo bacteriocina remete a peptídeos de baixo peso molecular produzidos por bactérias que apresentam atividade antimicrobiana com especificidade primária e ação restrita a isolados do mesmo gênero. Eles são produzidos tanto por bactérias Gram-positivo (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, bactérias *Propionibacterium*), quanto por bactérias Gram-negativo (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*), sendo *Lactobacillus* e *Lactococcus* os maiores produtores. As bacteriocinas são de natureza proteica e sua composição química, atividade biológica e imunidade da linhagem produtora as distinguem dos antibióticos. Correspondem a uma estratégia competitiva da linhagem produtora para inibir o crescimento de bactérias competindo por um mesmo nicho ecológico (BONINI *et al.*, 2012; KARPINSKI & SZKARADKIEWICZ, 2013). Estima-se que 99% das espécies de bactérias são capazes de produzir bacteriocina – assim, há uma considerável variedade desse composto, que pode vir a ser utilizado no tratamento de infecções (SNYDER & WOROBO, 2014).

De acordo com suas características estruturais, bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes (KARPINSKI & SZKARADKIEWICZ, 2013). Bacteriocinas da classe I são de tamanho pequeno (19 a 38 resíduos de aminoácidos), contendo aminoácidos modificados pós-tradução (lantionina e metillantionina) e são denominadas lantibióticos, sendo a nisina a principal representante (BIRRI *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2014; ESCANO *et al.*, 2015). A classe II compreende bacteriocinas com peso molecular abaixo de 10 kDa (37 a 48 resíduos de aminoácidos), e que não sofrem modificação pós-traducional. Como exemplo pode-se citar a pediocina PA1 (KESKA *et al.*, 2017; MOKOENA & PAUL, 2017; MESA-PEREIRA *et al.*, 2017). Já a Classe III é constituída por bacteriocinas de alto peso molecular (acima de 30kDa) e sensíveis ao calor, sendo subdividida em bacteriocinas com atividade lítica e bacteriocinas sem atividade lítica (SNYDER & WOROBO, 2014; COLLINS *et al.*, 2017). Bacteriocinas definidas como complexas contendo lipídeo ou seções de carboidratos estão incluídas na classe IV, são bacteriocinas cíclicas e como exemplo temos a Enterocin AS-48 (BIBALAN *et al.*, 2017; LAGHA *et al.*, 2017).

A nisina é um lantibiótico de 3,5 kDa carregado positivamente caracterizado por apresentar anéis intramoleculares formados por aminoácidos incomuns, como a lantionina e 3-metillantionina. Esta bacteriocina vem sendo utilizada há mais de 50 anos pela indústria alimentícia por ser efetiva contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos, principalmente contra bactérias Gram-positivo. Sua descoberta tem registro no ano de 1928, tendo sido extensivamente estudada desde então, aprovada nos EUA em 1988 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em alimentos, e a partir de então utilizada em mais de 50 países na conservação de vários tipos de alimentos (COLLINS *et al.*, 2012; BORDIGNON-JUNIOR *et al.*, 2012; SCHERER *et al.*, 2013).

A nisina apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivo e também atua inibindo a germinação de esporos. Entretanto, apresenta pouca ou nenhuma atividade contra bactérias Gram-negativo, fungos e vírus. Dependendo da concentração, a nisina pode apresentar atividade bactericida ou bacteriostática. A nisina primeiramente se liga ao peptídeo da parede celular por meio de interações iônicas formando poros na membrana citoplasmática, acarretando em alteração na permeabilidade e extravasamento de conteúdo intracelular levando a morte da célula bacteriana. Alguns estudos demonstraram a interferência na biossíntese da parede celular pela nisina, devido à habilidade de se ligar ao lipídeo II, um precursor da síntese da parede celular (ARAUZ *et al.*, 2012; BHATIA & BHARTI, 2014).

Vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico da nisina, principalmente contra patógenos resistentes. A nisina também tem apresentado atividade sinérgica em utilização conjunta com antibióticos a exemplo de; colistina contra *Pseudomonas aeruginosa*, antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos contra MRSA e VRE, dentre outros (FIELD *et al.*, 2016).

## **2.2 Uso terapêutico de bacteriocinas**

Vários grupos de pesquisa têm apontado o potencial terapêutico de bacteriocinas. O interesse no estudo terapêutico destes peptídeos parte de algumas características que os tornam mais atraentes em relação aos antibióticos tradicionais. Dentre essas características podemos citar: apresentam atividade contra microrganismos de importância clínica, incluindo linhagens resistentes a antibióticos como MRSA; apresentam mecanismo de ação distinto dos quimioterápicos tradicionais; possuem baixa toxicidade; podem ser produzidas *in situ* por linhagens probióticas; são passíveis de engenharia genética (DAWSON & SCOTT, 2012;

COTTER *et al.*, 2013). Além disso, bacteriocinas são ativas contra vários patógenos humanos atuando sem afetar a microbiota normal do corpo, quando comparado aos antibióticos, já que são inativadas por enzimas digestivas (NIGAM *et al.*, 2014).

Bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus*, *Lactococcus sp.* e *Streptococcus* têm sido apontadas como forma de tratamento alternativo contra a acne causada pela bactéria *Propionibacterium acnes* (CEBRIÁN *et al.*, 2017). Bacteriocinas produzidas por linhagens de *Streptococcus salivarius* têm sido pesquisadas para o tratamento da cárie dentária causada por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (DI PIERRO *et al.*, 2015). Estudos realizados com a bacteriocina microcina J25 mostraram potencial contra salmonelose (HASSAN *et al.*, 2012).

Estudos afirmam que bacteriocinas de classe IId (peptídeo MccE492), a depender de sua concentração, induzem alterações morfológicas características de apoptose ou de necrose e que assim podem atuar como agentes antitumorais (LAGOS *et al.*, 2009). Vários estudos têm sido realizados para a utilização de bacteriocinas produzidas por probióticos contra bactérias associadas a doenças crônicas ou agudas (COTTER *et al.*, 2013). A ação dessas substâncias foi avaliada em estudos referentes à obesidade (RIBOULET *et al.*, 2012; MURPHY *et al.*, 2013) – a partir dos quais identificou-se controle transitório de ganho de peso com o auxílio de bacteriocina – e a influência sobre o sistema imunológico através da ativação de células dendríticas e leucócitos mononucleares do sangue periférico (MEIJERINK *et al.*, 2010; HEMERT *et al.*, 2010). Além disso várias bacteriocinas como BMK2005 produzida por *Lactobacillus paracasei* subespécie *paracasei*, WX 153 produzidas por espécies de *L. lactis*, MXJ, produzida por *Lactobacillus coryniformis*, têm mostrado atividade contra patógenos resistentes a antibióticos (BENDEJEDDOU *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2014; SRIMARK & KHUNAJKR, 2015).

Dentre as bacteriocinas, os lantibióticos, ou seja, bacteriocinas pertencentes a Classe I, tem sido o foco de muitos grupos de pesquisa devido ao seu elevado potencial em destruir células-alvo rapidamente, incluindo patógenos resistentes a antibióticos (COTTER *et al.*, 2013; CAVERA *et al.*, 2015). Estes lantibióticos também tem demonstrando excelentes resultados *in vivo* (DAWSON & SCOTT, 2012; SANDIFORD, 2015).

A nisina é um lantibiótico produzido por certas cepas de *Lactococcus lactis* sendo a única aprovada para uso alimentar em 50 países (ALEGRIA *et al.*, 2010). Embora ainda não

seja aprovada para fins terapêuticos, vários estudos têm demonstrado o potencial desta bacteriocina no tratamento de doenças infecciosas (DOSLER & GERCEKER, 2011; OKUDA *et al.*, 2013; HEUNIS *et al.*, 2013). Heunis e colaboradores (2013) analisaram a eficácia de nanofibras contendo nisina no combate a cepas de *S. aureus*; nesse trabalho, a bacteriocina era liberada aos poucos, o que facilitaria a inibição de bactérias já existentes e a prevenção de novas infecções; além disso, essa nanofibra seria útil na cicatrização de feridas. Tong e colaboradores (2014) ainda demonstraram que a nisina pode intensificar a atividade microbicida de antibióticos quando combinada a eles, além de apresentar potencial para ser utilizada contra patógenos resistentes a antibióticos. Seguindo tal pensamento, Field e colaboradores (2016) perceberam a eficácia da associação entre nisina e colistina ou polimixina B contra bactérias formadoras de biofilmes se comparada às amostras controles não tratadas ou tratadas apenas com os antibióticos. Eles ainda afirmam que essa combinação pode ser útil ao combate de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Resistência a bacteriocinas tem sido descrito como um fenômeno raro quando comparado à resistência a antibióticos. Algumas bactérias podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida a ação antimicrobiana de bacteriocinas em geral, por meio de: transportadores ABC que removem a bacteriocina do envelope celular; conjunto de genes DLT necessário para a D-anilinação de ácido teicóico; proteína mprF que catalisa a adição de resíduos de membrana e proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (LUBELSKI *et al.*, 2006; THEDIECK *et al.*, 2006; VELAMAKANNI *et al.*, 2008). Com relação a resistência intrínseca, estudos recentes apontam a presença de proteínas de defesa contra lantibióticos encontradas em algumas bactérias patogênicas, semelhantes aquelas presentes em bactérias produtoras de lantibióticos, as quais são codificadas por genes específicos de imunidade, como por exemplo o gene *graXSR/vraFG* localizado em *S. aureus* o qual lhe confere resistência a nisina (KHOSA *et al.*, 2013; KHOSA *et al.*, 2016). Alguns outros mecanismos de resistência a nisina associadas a *S. aureus* são: ação da proteína nisinase, gene *purR* identificado em uma cepa mutante resistente a nisina, gene *vraDE*, e o sistema de dois componentes GrsRS; BraRS e VraSR (DRAPER *et al.*, 2015).

Entretanto, pelo fato de bacteriocinas ainda não serem utilizadas para fins terapêuticos, pouco se sabe sobre o impacto que seu uso possa ter na seleção de linhagens resistentes. Portanto, a aplicação clínica de bacteriocinas vai depender do entendimento do mecanismo e também o desenvolvimento de estratégias para prevenir o desenvolvimento de resistência no

futuro para assim evitar o problema vivenciado na atualidade com resistência aos antibióticos tradicionais (COTTER *et al.*, 2013).

### **2.3. *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA)**

*S. aureus* trata-se de uma bactéria pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivo, geralmente agrupados em uma forma semelhante a cachos de uva, encontrada principalmente na pele e nas mucosas nasais de cerca de 15% dos indivíduos saudáveis. São bactérias pertencentes a família *Micrococcaceae*, aeróbias ou anaeróbias facultativas, imóveis, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 µm (micrometro) de diâmetro, não-esporuladas e geralmente não-encapsuladas, apresentando reação de catalase e coagulase positivas (FRANÇOIS *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2017). Apresentam parede celular recoberta por uma cápsula de polissacarídeo, que protege o microrganismo ao inibir a fagocitose realizada por leucócitos polimorfonucleares (MURRAY *et al.*, 2014). Além disso, esse microrganismo também expressa como mecanismos de patogenicidade proteínas moduladoras, adesinas, enzimas extracelulares, leucocidinas e hemolisinas (PARLET *et al.*, 2016; KRAUSHAAR *et al.* 2017; BLEIZIFFER *et al.*, 2017) que ajudam o patógeno, principalmente cepas MRSA, a evadir do sistema imune inato do hospedeiro (ASKARIAN *et al.*, 2017).

Esta bactéria pode causar infecções em lesões cutâneas, além de quadros graves de infecções como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia até mesmo infecções sistêmicas, com risco de morte (TANG *et al.*, 2018). Por ser uma espécie bacteriana muito comum e a mais virulenta do seu gênero, é responsável pela maior parte de infecções adquiridas no ambiente hospitalar, onde os principais reservatórios são: pacientes colonizados, funcionários e o próprio ambiente hospitalar (STRYJEWski & COREY, 2014; DIAS *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2015). Por esse motivo constitui-se uma das espécies de maior interesse médico, sendo considerada um problema de saúde pública (PRINCE *et al.*, 2017; RAPHAEL *et al.*, 2017).

O uso de antibióticos é a forma mais comum utilizada para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo. Entretanto, tem se tornado muito comum a seleção de cepas de *S. aureus* resistentes a uma variedade de antibióticos, inclusive a meticilina (BASTOS *et al.*, 2013; PAIK *et al.*, 2017). Esta resistência é preocupante, pois pacientes infectados com MRSA apresentam maior risco de mortalidade além de aumentar os custos e o tempo de tratamento, em relação à aqueles que são infectados pela forma sensível (PETERS *et al.*,

2017; MOOSAVIAN *et al.*, 2018). Vários fatores contribuem para a seleção de linhagens resistentes, dentre eles a utilização indiscriminada, empírica e cotidiana de antimicrobianos, além de alterações genéticas no patógeno causadas por mutações ou transferência horizontal de genes (GRILLO *et al.*, 2013). As mutações podem ocorrer durante o processo de replicação celular bacteriana e a transferência horizontal de gene quando uma bactéria passa o determinante genético para outras bactérias através de conjugação, transformação ou a transdução (COSTA & JUNIOR, 2017).

Foi relatado resistência à penicilina por *S. aureus*, pela primeira vez, em 1942 por Alexander Fleming. Isto ocorreu apenas um ano após a introdução desta droga. Além disso, esta bactéria foi capaz de adquirir resistência, ao longo dos anos, a outros antibióticos tais como a eritromicina, tetraciclina e a estreptomicina (STRYJEWski & COREY, 2014). A meticilina foi criada em 1959 com o intuito de tratar infecções causadas por *S. aureus* resistentes a penicilina (ENRIGHT *et al.*, 2002). No entanto, no ano de 1961 era descrito pela primeira vez resistência a meticilina por *S. aureus*. Dados do National Healthcare Safety Network (NHSN), do Center for Diseases Control and Prevention (CDC) (2015), nos Estados Unidos da América (EUA), mostraram que, entre 1997 a 2007, a proporção de MRSA ultrapassava 50% entre os pacientes hospitalizados (BODNAR *et al.*, 2016). No Brasil, vários estudos têm demonstrado prevalência de infecções hospitalares por *S. aureus* variando entre 17% a 26%, e aproximadamente 70% a 100% são causadas por MRSA (CATÃO *et al.*, 2013).

Inicialmente, a presença deste patógeno era restrita a ambiente hospitalar (HA-MRSA). Entretanto, com o passar dos anos, o aumento da prevalência de linhagens de MRSA passou a ocorrer tanto em ambiente hospitalar quanto em ambientes comunitários (CA-MRSA), como creches, escolas, entre outros (CALFEE, 2012). Estudos moleculares e microbiológicos têm demonstrado que linhagens HA-MRSA e CA-MRSA apresentam perfis genéticos e fenotípicos distintos, sendo que HA-MRSA é considerado um patógeno oportunista e CA-MRSA capaz de causar infecções em pessoas saudáveis (CHMIELARCZYK *et al.*, 2016; NG *et al.*, 2017). Desde seu surgimento, CA-MRSA se tornou o patógeno de maior significância em várias partes do mundo e sua prevalência tem ultrapassado os casos adquiridos em hospital (ABDALLAH, 2016; SHASHINDRAN *et al.*, 2016).

As infecções por MRSA relacionadas ao ambiente hospitalar atingem normalmente pessoas que sofreram trauma cutâneo, cirurgias, aplicação de dispositivos intravenosos e hemodiálise, podendo inclusive complicar tratamentos devido à formação de biofilmes em

cateteres e implantes (BHATTACHARYA *et al.*, 2015; DÍEZ *et al.*, 2016; DIAS-SOUZA *et al.*, 2018). Infecções causadas por CA-MRSA são comumente adquiridas por meio de contato direto e compartilhamento de objetos pessoais (como lâminas de barbear e toalhas) e esse risco pode aumentar entre usuários de drogas injetáveis, sem higiene pessoal adequada ou portadores do vírus HIV ou ainda entre indivíduos em grandes aglomerados, como atletas, crianças em creches ou escolas, quartéis e penitenciárias (PITTET *et al.*, 2000; WALLIN *et al.*, 2008).

Resistência a meticilina significa resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, sendo determinada por um gene cromossômico (*mecA*) que codifica uma proteína ligadora de penicilina (PBP2a). Evidências indicam que *S. aureus* adquiriu o gene *mecA* de vários microrganismos por transferência lateral (LAURENT *et al.*, 2012; STEFANI *et al.*, 2012). Este gene está localizado em uma ilha genética denominada cassete cromossômico de *Staphylococcus* (SCC*mec*) e diferenças nestes cassetes são utilizadas para distinguir HA-MRSA de CA-MRSA. HA-MRSA apresentam um elemento SCC*mec* dos tipos I, II e III, que contém genes adicionais de resistência a antibióticos não lactâmicos, sendo portanto multirresistentes. Já linhagens de CA-MRSA apresentam o cassete SCC*mec* dos tipos IV e V, apresentando um espectro limitado de resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, sendo resistente apenas a meticilina (PETERSDORF *et al.*, 2015; RAJEH *et al.*, 2015). Outro gene associado a resistência a meticilina por MRSA é o gene *mecC* o qual trata-se de um homólogo do gene *mecA* presente em animais da fazenda e da vida selvagem (KRIEGESKORTE *et al.*, 2018). Além dos genes de resistência, CA-MRSA possui com maior frequência em relação à HA-MRSA a toxina formadora de poros Panton Valentin Leucocidina (PVL), codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV*, que causam destruição de leucócitos e necrose do tecido (COOKE & BROWN, 2010; BROWN *et al.*, 2012).

O controle de *S. aureus* tanto no ambiente hospitalar, como no comunitário é uma preocupação em nível de saúde pública. A higienização das mãos, a identificação e o isolamento de portadores de MRSA, a descolonização do paciente e a descontaminação do ambiente são os principais métodos de controle de infecção por HA-MRSA. HA-MRSA é mais comumente transmitido pelo contato das mãos de profissionais da saúde (SIEGEL *et al.*, 2008; KINOSHITA *et al.*, 2017). O isolamento dos pacientes contaminados por MRSA também evita a transmissão dentro dos hospitais. Para isso algumas medidas são adotadas, tais como o uso de quarto privado, uso de avental e luvas descartáveis para contato com o paciente

e com áreas potencialmente contaminadas no ambiente (SIEGEL *et al.*, 2008; SAMPEDRO & WARDENBURG, 2017).

Considerando o fato de que *S. aureus* tem sido o patógeno bacteriano mais proeminente e a emergência de CA-MRSA, estudos relacionados ao desenvolvimento de métodos alternativos para o controle deste patógeno são de extrema importância. Bacteriocinas tem sido consideradas uma alternativa promissora. (AUNPAD & KAEWKLOM, 2013).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Testar a atividade antimicrobiana da nisina contra linhagem de *Staphylococcus aureus* resistentes (MRSA) e sensíveis (MSSA) a meticilina.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar genotipicamente linhagens de MRSA e MSSA.
- Verificar o espectro de atividade da nisina contra MSSA e MRSA.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a dose bactericida mínima (DBM) da nisina contra MSSA e MRSA.
- Verificar o efeito da bacteriocina no crescimento de MSSA e MRSA.
- Selecionar linhagens de MSSA e MRSA resistentes a bacteriocina.
- Verificar a estabilidade do fenótipo de resistência a bacteriocina.
- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos entre linhagens de MSSA e MRSA resistentes a bacteriocina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para este estudo foram utilizadas 7 cepas MRSA e 30 cepas MSSA de origem humana criopreservadas, que fazem parte do acervo do Laboratório de Bacteriologia situado no Departamento de Morfologia, localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Sergipe (LABAC/DMO/CCBS/UFS). Tais cepas foram isoladas de amostras de secreção da oro e nasofaringe de um total de 170 profissionais de enfermagem da rede de urgência e emergência da Secretaria Municipal de Saúde de Aracaju-SE, projeto este aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, sob o registro CAAE nº 0044.0.107.000-11.

Os microrganismos foram cultivados a 35°C em ágar Sal manitol (Himedia) e submetidos à coloração de Gram e a análise microscópica para confirmação da pureza das culturas. Para os demais experimentos, MRSA e MSSA foram cultivados em meio BHI (Brain Heart Infusion, Himedia) ou Mueller Hinton (MH, Himedia) a 35°C. A confirmação do fenótipo de resistência à metilina foi realizada pelo método de disco-difusão descrito pelo CLSI (2017), que preconiza halo igual ou inferior a 21 mm para o antibiótico cefoxitina (CFO). Para todos os experimentos foram utilizadas como controle as cepas de referência *S. aureus* ATCC33591 (CFO resistente/Origem humana) e *S. aureus* ATCC25923 (CFO sensível). Para o procedimento de PCR também foi utilizado a cepa controle *S. aureus* ATCC1874a (CFO resistente/Origem animal).

### 4.2 Caracterização genotípica de linhagens MRSA e MSSA

Para a caracterização genotípica dos isolados MRSA e MSSA, foram utilizados os genes *nucA*, *mecC*, *mecA* e *luckPV* (Tabela 1). O DNA das culturas foi extraído seguindo metodologia descrita pelo manual do Genomic DNA Purification Kit da Promega. A quantificação do DNA foi realizada utilizando o aparelho Epoch da BioTek em que o resultado foi observado utilizando o software de computador Gen5 versão 2.05 da mesma empresa. A amplificação dos genes foi realizada no termociclador Mastercycler da POCD Scientific onde as condições de PCR se repetiram por 40 ciclos seguindo o seguinte esquema:

temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, 94° C por mais 1 minuto, 55° C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 72° por mais 5 minutos. Após o PCR o material foi submetido ao método de eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando o aparelho Electrophoresis Power Supply da Loccus Biotecnologia. O resultado da corrida em gel foi observado através do aparelho UVP Chem Studio da Analytikjena em que os dados foram transferidos e analisados através do programa de computador AJ Software da mesma empresa. Para todo este procedimento foram utilizadas as cepas padrões *S. aureus* ATCC25923 (CFO sensível), *S. aureus* ATCC33591 (CFO resistente/Origem humana) e *S. aureus* ATCC1874a (CFO resistente/Origem animal).

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para a caracterização genotípica de MRSA e MSSA.

| Gene          | Primer   | Sequência 5'-3'          | Referência                             |
|---------------|----------|--------------------------|--|
| <i>nucA</i>   | NUC1     | GCGATTGATGGTGATACGGTT    | ZHANG <i>et al.</i> , 2004             |
|               | NUC2     | AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC |  |
| <i>mecA</i>   | MecA-F   | TCCAGATTACAACCTTCACCAGG  | OLIVEIRA e<br>LENCASTRE, 2002          |
|               | MecA-R   | CCACTTCATATCTTGTAACG     |  |
| <i>mecC</i>   | MecC-F   | GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC  | GARCIA-ALVAREZ<br><i>et al.</i> , 2011 |
|               | MecC-R   | AAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC   |  |
| <i>luckPV</i> | LuckPV-F | ATCCGAGAGACTATTTTGTGC    | RIBEIRO <i>et al.</i> ,<br>2005        |
|               | LuckPV-R | CATCAACCTTTTCTCACTTAC    |  |

### 4.3 Preparo da nisina e espectro da atividade contra MRSA e MSSA

A nisina (Chrisin C; CHL Hansen; 1000 UI/mg) foi preparada pela diluição de 20 mg/mL (1000 UI-Unidades internacionais da nisina /mg) em solução salina (0,85%) com pH ajustado para 2,0 (HCl 1M). O espectro de atividade da nisina contra MRSA e MSSA foi testado pelo método de difusão em ágar descrito por Hoover e Harlander (1993). Aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC das linhagens de MSSA e MRSA, padronizada pela escala de McFarland, foram inoculadas pelo método de espalhamento em superfície em ágar BHI vertido (15 mL) em placas descartáveis (90x15 mm) e orifícios de 5 mm de diâmetro foram feitos. Uma alíquota de 25 µl da bacteriocina foi adicionada aos orifícios. As placas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 4 °C para difusão da bacteriocina e posteriormente na temperatura de crescimento do microrganismo. Após 24 ou 48 h de incubação foi verificada a presença de halos de inibição ao redor dos orifícios.

#### **4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina contra MRSA e MSSA**

A CIM e a DBM da nisina para as cepas de MRSA e MSSA, foram determinadas pelo método de microdiluição padronizado pelo CLSI M100 (*Clinical and Laboratory Standards Institutes*, 2017). Concentrações crescentes da nisina foram acrescidas em meio líquido Mueller-Hinton distribuído em placa de Elisa e aproximadamente  $10^6$  UFC/mL dos microrganismos foram inoculados em cada pocinho. As placas foram incubadas por 24 h a  $35^\circ\text{C}$ . A CIM foi definida como a menor concentração requerida para impedir completamente o crescimento bacteriano por 24 h (SOUZA *et al.*, 2009). Para a determinação da DBM, todo conteúdo das amostras (100  $\mu\text{L}$ ) em que não houve crescimento foram semeadas em meio sólido BHI e após 24 h a presença de colônias foram analisadas. A dose bactericida mínima foi definida como a menor concentração que resultou na formação de nenhuma colônia em meio sólido (SUFFREDINI *et al.*, 2007).

#### **4.5 Efeito da nisina no crescimento de MRSA e MSSA**

Para testar o efeito da nisina no crescimento de MRSA e MSSA, concentrações crescentes da bacteriocina (0, 200 e 400 UI/mL para MSSA e 0, 400 e 1600 UI/mL para MRSA), considerando a faixa dos valores de CIM tanto da linhagem mais sensível (com menor CIM) bem como a linhagem menos sensível (com maior CIM) selecionadas, foram adicionadas ao meio BHI líquido e o crescimento das culturas foi monitorado pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm utilizando um Espectrofotômetro leitor de microplacas da marca PowerWave HT da empresa BioTek. A análise dos dados foi feita através do software Gen5 da mesma empresa. Foi determinada a velocidade específica de crescimento ( $\mu \text{ h}^{-1}$ ), a duração da fase lag (h) e o valor máximo de DO ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) obtido pelas culturas. Para determinação da taxa de crescimento, pelo menos três valores de DO na fase logarítmica de crescimento foram convertidos aos respectivos valores de LN (logaritmo neperiano) e foi traçado gráfico de LN de DO versus tempo de crescimento. A taxa de crescimento ( $\mu \text{ h}^{-1}$ ) corresponde à inclinação da reta com  $R^2$  próximo a 1. Considerando a equação da reta  $Y=ax+b$ ,  $\mu = a$ . Foram utilizadas todas as linhagens de MRSA sensíveis a bacteriocina ( $n=5$ ) e foram selecionadas as linhagens MSSA02, MSSA07, MSSA09, MSSA12, MSSA14 e MSSA29, por apresentarem grau diferente de sensibilidade à bacteriocina.

#### **4.6 Seleção de linhagens de MRSA e MSSA resistentes a nisina**

Para verificar a seleção de linhagens resistentes à nisina, culturas de MRSA e MSSA foram transferidas a cada 12 horas em meio BHI contendo doses subletais da bacteriocina, dando um total de 30 transferências. A dose subletal foi considerada como 50% do valor da CIM. Para verificar a seleção de células resistentes, a cada 05 transferências a sensibilidade do microrganismo à bacteriocina foi reavaliada pelo método de difusão em meio sólido descrito no item 4.3. Diluições crescentes da bacteriocina (incrementos de 2x) foram realizadas e adicionadas em orifícios de 5 mm feitos em meio sólido previamente inoculado com os microrganismos. As placas foram incubadas por 12 h em temperatura de refrigeração para difusão da bacteriocina e por 24 h a 37° C para crescimento dos microrganismos. A presença de halos de inibição ao redor dos orifícios foi analisada e a atividade da bacteriocina em unidades arbitrárias por mL (UA/mL) foi determinada como o recíproco da maior diluição que causou a formação de halo visível. Na última transferência as culturas também foram submetidas a ensaio para determinação da CIM como descrito no item 4.4.

Para verificar se a resistência a bacteriocina é um fenótipo estável, as linhagens resistentes foram transferidas em meio BHI na ausência da bacteriocina e a sensibilidade também foi testada a cada 5 transferências e a CIM determinada ao final do experimento, como já descrito.

#### **4.7 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de linhagens sensíveis e resistentes a bacteriocina**

Para as linhagens MRSA e MSSA selecionadas para resistência a bacteriocina, foi verificado se o perfil de suscetibilidade a antibióticos foi alterado, resubmetendo as culturas ao antibiograma seguindo as recomendações do CLSI M100 (2017). A leitura do diâmetro do halo de inibição do crescimento foi realizada com 24 h de incubação a 35°C. As cepas de *S. aureus* que apresentarem halos de sensibilidade menor ou igual a 21 mm para o disco de cefoxitina (CFO) foram classificadas como resistentes (MRSA). Foram utilizadas como controle as cepas de referência *S. aureus* ATCC33591 (CFO resistente) e *S. aureus* ATCC25923 (CFO sensível). Os discos de antibióticos utilizados, a concentração e as medidas dos halos estão descritos na Tabela 3.

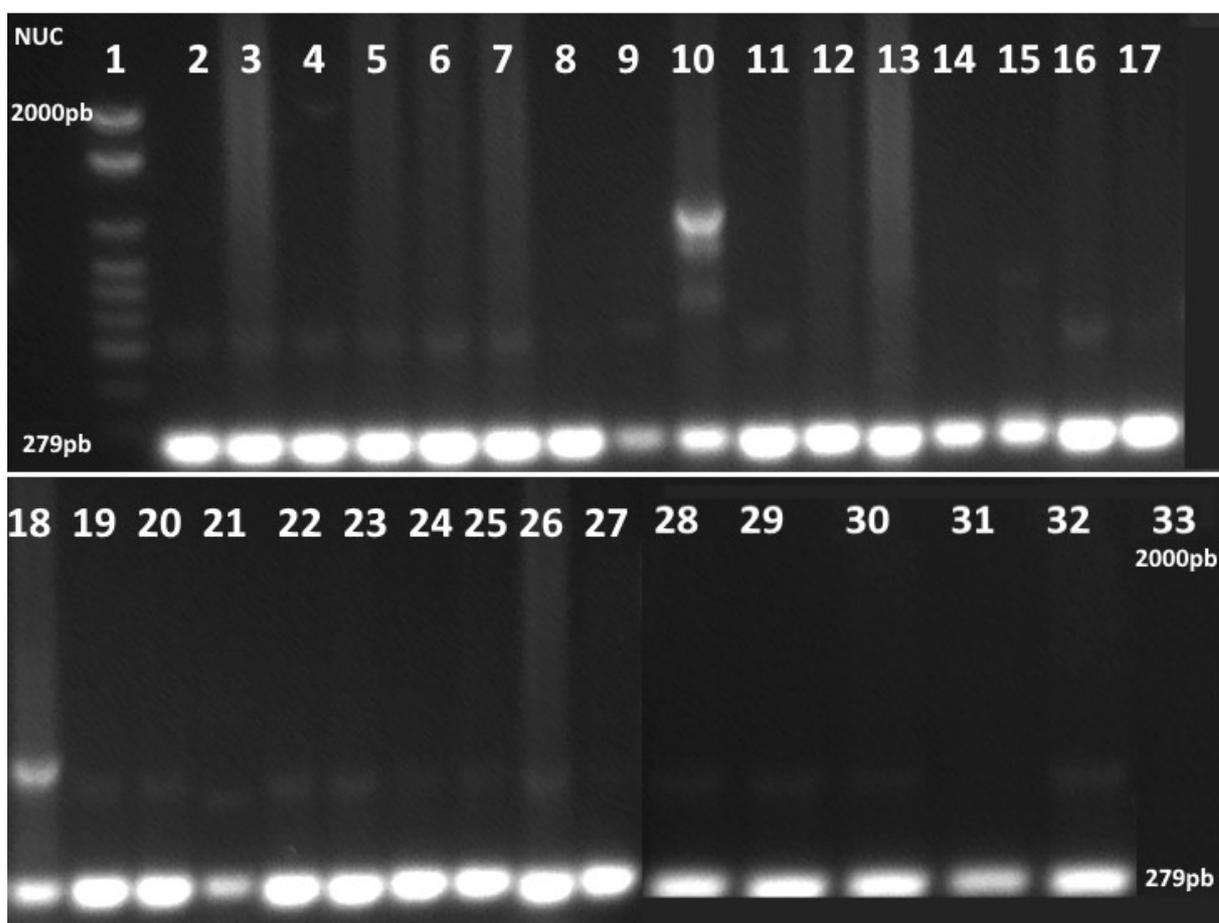
**Tabela 2.** Padrões para teste de sensibilidade usando difusão em disco segundo CLSI (2017)

| Antibiótico    | Concentração do disco | Diâmetro da zona de inibição (mm) |          |
|----------------|-----------------------|-----------------------------------|----------|
|                |                       | Resistente                        | Sensível |
| Cefoxitina     | 30 µg                 | ≤ 21                              | ≥ 22     |
| Clidamicina    | 02 µg                 | ≤ 14                              | ≥ 21     |
| Oxacilina      | 30 µg                 | ≤ 13                              | ≥ 14     |
| Eritromicina   | 10 µg                 | ≤ 13                              | ≥ 23     |
| Ciprofloxacina | 05 µg                 | ≤ 15                              | ≥ 21     |
| Gentamicina    | 10 µg                 | ≤ 12                              | ≥ 15     |
| Sulfametoxazol | 23,75 µg              | ≤ 10                              | ≥ 16     |

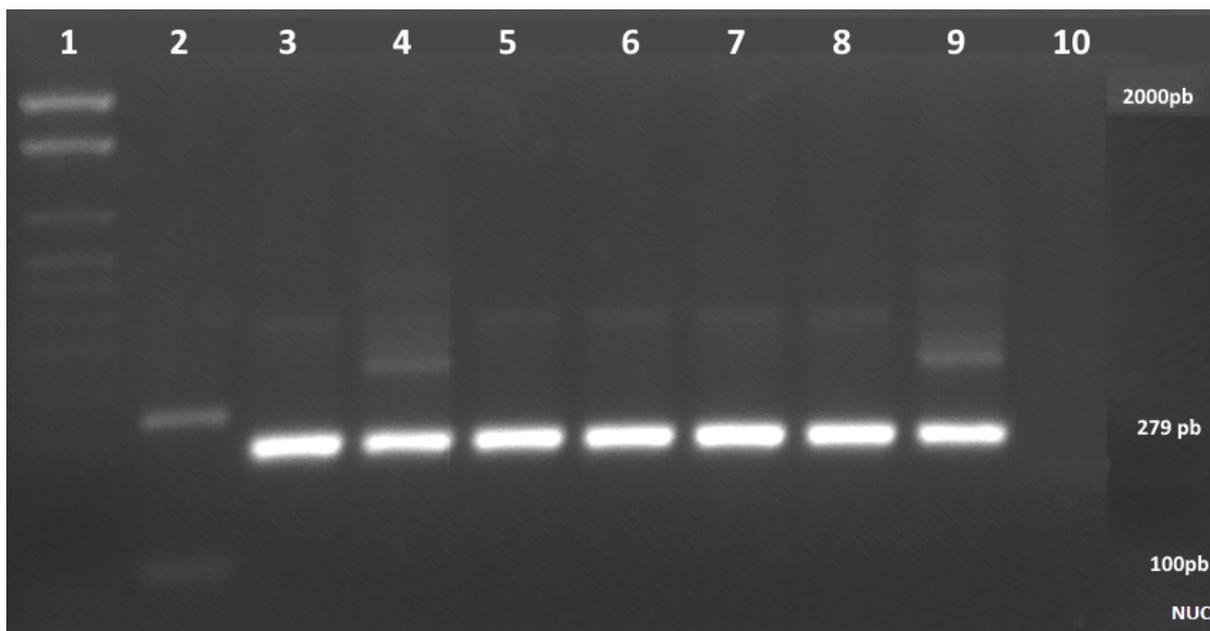
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização genotípica

Todas as linhagens de MSSA (n=30) e MRSA (n=7) tiveram seu DNA extraído e purificado para a realização do PCR. O primeiro gene pesquisado foi o *nucA*, gene característico de *S. aureus* e que é utilizado para identificação genotípica desta espécie. Todas as linhagens de MSSA, incluindo a cepa padrão MSSA *S. aureus* ATCC25923, apresentaram a banda referente ao gene *nucA* (Figura 1). Dentre as linhagens de MRSA, todas, com exceção da linhagem MRSA01, amplificaram o gene *nucA*, confirmando a identificação da espécie *S. aureus* (Figura 2). A linhagem MRSA negativa para esse gene foi descartada dos demais experimentos por não ser da espécie *aureus*.

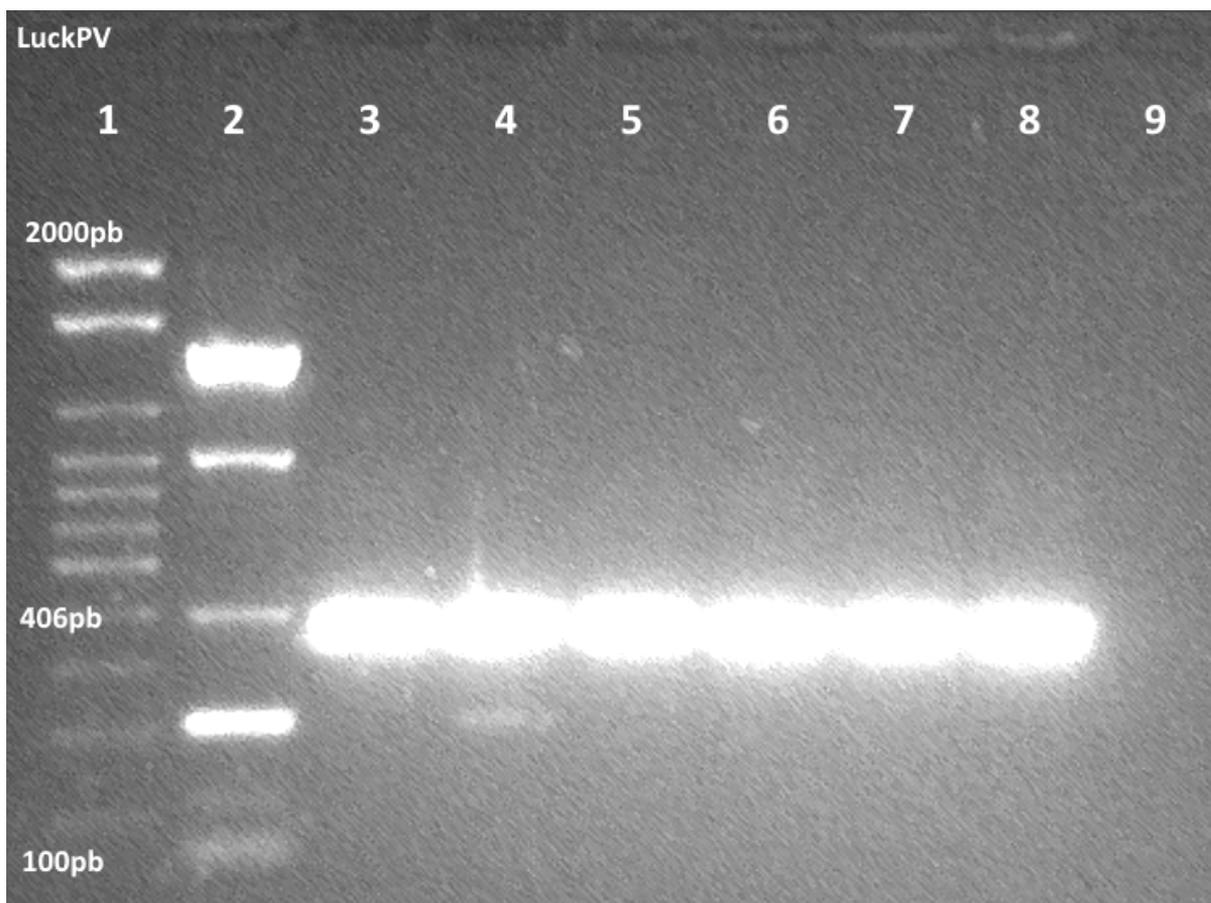


**Figura 1:** Produto de amplificação do gene *nucA* em linhagens de MSSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. Linha 1: Marcador de baixo peso molecular (100pb). Linhas 2-31: Linhagens MSSA NUC positivo. Linha 32: Controle positivo *S. aureus* ATCC25923. Linha 33: Controle negativo.



**Figura 2:** Produto de amplificação do gene *nucA* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. Linha 1: Marcador de baixo peso molecular (100pb). Linha 2: Linhagem MRSA01 negativo para o NUC. Linhas 3-8: Linhagens MRSA NUC positivo. Linha 9: Controle positivo MRSA *S. aureus* ATCC33591. Linha 10: Controle negativo.

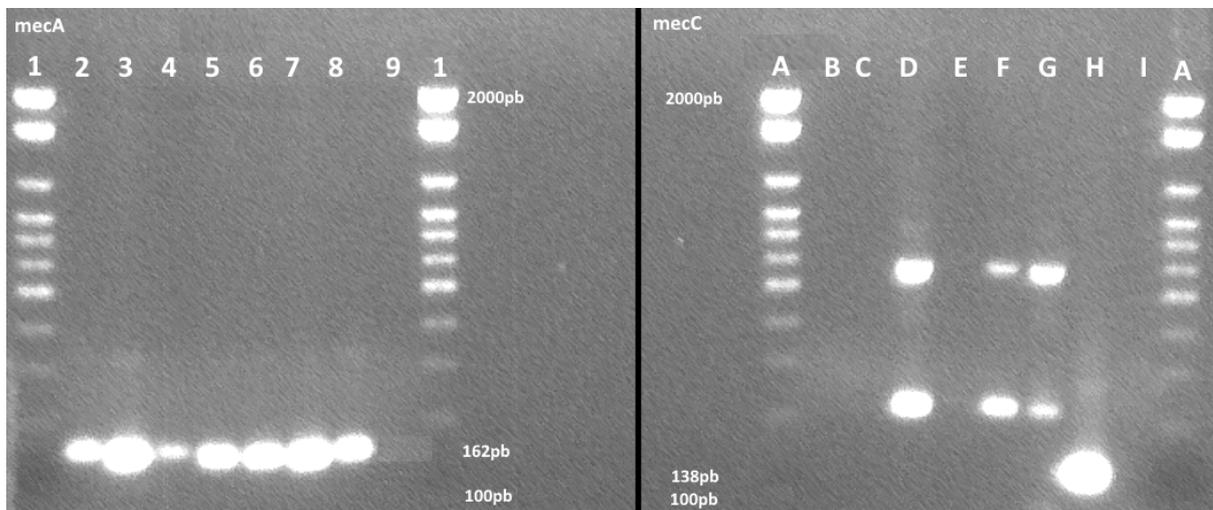
As mesmas linhagens de MSSA e MRSA foram utilizadas para a pesquisa do gene *luckPV*. Esse gene codifica a leucocidina Panton-Valentine (PVL), uma toxina que é letal para os leucócitos, e que é mais comumente encontrada em linhagens associadas a comunidade (CA-MRSA). Para as linhagens MSSA, a presença deste gene não foi detectada (resultados não mostrados). Todas as linhagens de MRSA, bem como a cepa padrão *S. aureus* ATCC33591, foram positivas para amplificação do gene *luckPV* (Figura 3). A amplificação deste gene indica que estas linhagens são oriundas de ambientes comunitários (locais com aglomeração de pessoas) e que os profissionais da área de saúde, contaminados, acabam sendo os veículos para a entrada destas linhagens em ambientes hospitalares. Estudos tem demonstrado que CA-MRSA tornou-se o patógeno mais significativo em várias partes do mundo e sua prevalência superou os casos adquiridos em hospital (CALFEE *et al.*, 2012; VUONG *et al.*, 2016; TOGNERI *et al.*, 2017). Além disso, CA-MRSA também tem sido detectado em unidades de saúde. Isso gera uma preocupação pelo fato de serem mais virulentos do que HA-MRSA, podendo tornar mais grave o estado de saúde dos pacientes. Cabe ao Ministério da Saúde e às Unidades de Saúde traçarem estratégias para evitar a transmissão de MRSA dentro do ambiente hospitalar.



**Figura 3:** Produto de amplificação do gene *luckPV* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. Linha 1: Marcador de baixo peso molecular (100pb). Linha 2: Linhagem MRSA02 apresentando banda fraca, mas positiva. Linhas 3-7: Linhagens MRSA *luckPV* positivo. Linha 8: Controle positivo *S. aureus* ATCC33591. Linha 9: Controle negativo.

A presença dos genes *mecA*, que determina resistência a meticilina em linhagens de MRSA de origem humana, e *mecC*, que tem como principal fonte linhagens de MRSA oriundas de animais (LA-MRSA), também foi analisada nas mesmas linhagens anteriores. Essa análise foi realizada tanto para linhagens MRSA quanto MSSA, para verificar a possibilidade das linhagens MSSA apresentarem esse gene sem o mesmo ser expresso. Apesar de todas as amostras serem de origem humana a pesquisa do gene *mecC* foi realizada pois o homem também pode ser infectado por linhagens de LA-MRSA. Como observado para o gene *luckPV*, para as linhagens MSSA nem o gene *mecA* e nem *mecC* foram detectados. Já entre as linhagens de MRSA, todas, incluindo o controle positivo *S. aureus* ATCC33591, apresentaram resultado positivo para amplificação do gene *mecA* e negativo para o gene *mecC*, que só foi amplificado na linhagem utilizada como controle positivo para esse gene, *S.*

*aureus* ATCC1874a (Figura 4). Esse resultado confirma genotipicamente a resistência a meticilina nestas linhagens e que as mesmas são de origem humana.



**Figura 4:** Produto de amplificação dos genes *mecA* e *mecC* em linhagens de MRSA. O produto de PCR das linhagens foi separado em gel de agarose a 1,5% e observado contra a luz ultravioleta. Linhas 1 e A: Marcador de baixo peso molecular (100pb). Linhas 2-7: Linhagens MRSA *mecA* positivo. Linhas B-G: Linhagens MRSA *mecC* negativo. Linha 8: Controle positivo *S. aureus* ATCC33591. Linha H: Controle positivo *S. aureus* ATCC1874a. Linhas 9 e I: Controle negativo.

## 5.2 Espectro de atividade da nisina contra MRSA e MSSA

Das 30 cepas de MSSA testadas, 80 % apresentaram sensibilidade à bacteriocina (Tabela 3) incluindo a padrão *S. aureus* ATCC25923. Em relação às linhagens MRSA (n=6), somente para uma cepa não foi verificada a formação de halo de inibição (Tabela 4). No teste de difusão em ágar, a bacteriocina difunde radialmente a partir do orifício para o meio de cultura. Entretanto, vários fatores podem interferir na difusão da bacteriocina em meio sólido, e conseqüentemente, no tamanho do halo de inibição formado, como por exemplo a quantidade de meio de cultura (OSTROSKY *et al.*, 2008). Portanto, este teste inicial é utilizado apenas para verificar qual das linhagens apresenta ou não sensibilidade à bacteriocina. Para um maior entendimento do grau de sensibilidade das linhagens à bacteriocina, foi determinada a CIM e DBM, descritas a seguir.

**Tabela 3:** Espectro de atividade da nisina contra MSSA. São apresentados presença (+) ou não (-) de halo de inibição e valores de concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina para MSSA.

| Linhagem                      | Halo de inibição | CIM(UI/mL)     | DBM(UI/mL)     |
|-------------------------------|------------------|----------------|----------------|
| MSSA01                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA02                        | +                | 97,7±0*        | 97,7±0*        |
| MSSA03                        | +                | 781,12±0*      | >25000         |
| MSSA04                        | +                | 390,60±0*      | 390,60±0*      |
| MSSA05                        | +                | 195,30±0*      | 195,30±0*      |
| MSSA06                        | +                | 195,30±0*      | 195,30±0*      |
| MSSA07                        | +                | 234,40±0*      | 234,40±0*      |
| MSSA08                        | +                | 781,20±0*      | >50000         |
| MSSA09                        | +                | 390,60±0*      | >50000         |
| MSSA10                        | +                | 390,60±0*      | >50000         |
| MSSA11                        | +                | 312,50±0*      | 7500±3535,54*  |
| MSSA12                        | +                | 1250±0*        | 1250±0*        |
| MSSA13                        | +                | 390,60±0*      | >50000         |
| MSSA14                        | +                | 292,90±138,10* | 292,90±138,10* |
| MSSA15                        | +                | 390,60±0*      | >10000         |
| MSSA16                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA17                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA18                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA19                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA20                        | +                | 195,30±0*      | 6250±0*        |
| MSSA21                        | +                | 195,30±0*      | 4688±0*        |
| MSSA22                        | -                | ND             | ND             |
| MSSA23                        | +                | 351,60±165,74* | >50000         |
| MSSA24                        | +                | 312,50±0*      | 312,50±0*      |
| MSSA25                        | +                | 234,30±110,52* | 234,30±110,52* |
| MSSA26                        | +                | 390,60±0       | ND             |
| MSSA27                        | +                | 156,20±0*      | 195,30±0*      |
| MSSA28                        | +                | 390,60±0*      | ND             |
| MSSA29                        | +                | 488,20±483,30* | 878,90±966,76* |
| MSSA30                        | +                | 293±139,30*    | 293±139,30*    |
| <i>S. aureus</i><br>ATCC25923 | +                | 1250±0*        | 5000±0*        |

\* Desvio Padrão

<sup>a</sup>ND = Não determinado

*S. aureus* ATCC25923 = Cepa padrão MSSA

**Tabela 4:** Espectro de atividade da nisina contra MRSA. São apresentados presença (+) ou não (-) de halo de inibição e valores de concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina para MRSA.

| Linhagem                      | Halo de inibição | CIM(UI/mL)    | DBM(UI/mL) |
|-------------------------------|------------------|---------------|------------|
| MRSA02                        | -                | ND            | ND         |
| MRSA03                        | +                | 2500±0*       | >10000     |
| MRSA04                        | +                | 937,5±441,94* | >10000     |
| MRSA05                        | +                | 1250±0*       | >10000     |
| MRSA06                        | +                | 2500±0*       | 5000±0*    |
| MRSA07                        | +                | 1875±883,88*  | 5000±0*    |
| <i>S. aureus</i><br>ATCC33591 | +                | 937,5±441,94* | 1250±0*    |

\* Desvio Padrão

*S. aureus* ATCC33591 = Cepa padrão MRSA

### 5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e dose bactericida mínima (DBM) da nisina contra MRSA e MSSA

Todos os microrganismos que apresentaram sensibilidade à bacteriocina foram submetidos ao teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da dose bactericida mínima (DBM). A CIM das linhagens de MSSA variou de 97,7 a 1250UI/mL, mas a CIM mais comum entre elas (30 %) foi de 390,6 UI/mL da bacteriocina (Tabela 3). A cepa padrão *S. aureus* ATCC25923 apresentou o maior valor de CIM igual à linhagem MSSA12 (Tabela 3). Para as linhagens MRSA, os valores de CIM variaram entre 937,50 a 2500 UI/mL (Tabela 4), cerca de 4 a 6 vezes superior a média dos valores de CIM apresentados pelas linhagens de MSSA. A cepa padrão *S. aureus* ATCC33591 e a linhagem MRSA04 tiveram CIM igual a 937,50. Estes resultados mostram variação no grau de sensibilidade à bacteriocina tanto para linhagens MSSA quanto para linhagens MRSA. Os maiores valores de CIM foram observados para linhagens MRSA, o que pode indicar que resistência a meticilina pode de alguma forma diminuir a sensibilidade das linhagens à nisina.

Bacteriocinas são reconhecidas por exercer atividade bacteriostática (inibição do crescimento celular) ou bactericida (morte celular) dependendo da concentração (COTTER *et al.*, 2013; SNYDER & WOROBO, 2014). No caso do efeito ser exclusivamente bactericida, a CIM é igual a DBM, e quando a atividade bactericida depende da concentração, a DBM é maior que a CIM.

A DBM para as linhagens de MSSA variou de 97,7 UI/mL a valores superiores a 50000 UI/mL, e para MRSA esta variação ficou entre 5000 UI/mL a valores maiores que 10000 UI/mL dependendo da linhagem (Tabela 3 e 4). Para 10 linhagens MSSA, a DBM foi igual a CIM, mostrando que o mecanismo de ação da nisina para estas linhagens é bactericida, independente da concentração (Tabela 3). Entretanto, para as demais linhagens de MSSA e para as linhagens de MRSA, a DBM foi superior à CIM, mostrando que o efeito da bacteriocina depende da concentração da mesma: baixas concentrações exercem efeito bacteriostático e altas concentrações efeito bactericida. As cepas padrão *S. aureus* ATCC25923 e *S. aureus* ATCC33591 tiveram os valores de DBM menores do que as demais linhagens de MSSA, em alguns casos, e MRSA respectivamente (Tabela 3 e 4). Para algumas linhagens, dentre as MSSA, não foi possível determinar a DBM por esta atingir valores muito elevados ou mesmo pelo fato da bacteriocina exercer apenas atividade bacteriostática contra os microrganismos. Para as linhagens MRSA, a DBM foi sempre maior que a CIM.

Com estes resultados pode-se observar que as linhagens testadas apresentam perfis variados de sensibilidade à bacteriocina. Para as linhagens MRSA, na maioria das vezes, é necessário uma concentração maior da nisina, quando comparada as linhagens MSSA, para desempenhar seu efeito bacteriostático e/ou bactericida. Dosler e Gerceker (2011), também testaram o efeito da nisina contra MRSA e MSSA. Entretanto, apesar das condições experimentais não serem as mesmas, esses autores não verificaram diferenças na sensibilidade à bacteriocina em relação a CIM e a DBM entre as linhagens testadas. Estes resultados indicam que sensibilidade à bacteriocina é uma característica heterogênea entre as linhagens MRSA e este ponto necessita ser investigado antes da aplicação terapêutica da nisina. Porém tal resultado não inviabiliza a aplicação da nisina, já que há uma série de parâmetros que ainda podem ser avaliados como por exemplo a quantificação da dosagem adequada.

#### **5.4 Efeito da nisina no crescimento de MRSA e MSSA**

Para verificar o efeito da nisina no crescimento das linhagens MSSA, foram selecionadas as linhagens MSSA02, MSSA07, MSSA09, MSSA12, MSSA14 e MSSA29, por apresentarem grau diferente de sensibilidade à bacteriocina, além da cepa padrão *S. aureus* ATCC25923. Os resultados obtidos mostraram que a adição de concentrações crescentes da bacteriocina ao meio BHI resultaram, de uma maneira geral, no aumento da fase lag e

diminuição da velocidade específica de crescimento e DO máxima atingida pelos microrganismos. Na maioria dos casos, não foi possível determinar a taxa de crescimento das linhagens MRSA e MSSA na presença da nisina, pois essa estendeu a fase lag das culturas por mais de 6 h, dificultando a obtenção de pontos suficientes na fase logarítmica de crescimento para realização dos cálculos necessários, O mesmo resultado foi verificado para a cepas padrão (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5:** Efeito da nisina nos parâmetros de crescimento de linhagens MSSA.

| Linagem                    | Bacteriocina<br>(UI/mL) | $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) | Fase Lag (h) | D.O. máx |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|----------|
| MSSA02                     | 0                       | 0,31                     | 4            | 0,792    |
|                            | 200                     | ND                       | > 48         | 0,065    |
|                            | 400                     | -                        | > 48         | 0,062    |
| MSSA07                     | 0                       | 0,26                     | 5            | 1,073    |
|                            | 200                     | ND                       | >8           | 0,125    |
|                            | 400                     | -                        | >48          | 0,087    |
| MSSA09                     | 0                       | 0,31                     | 4            | 1,156    |
|                            | 200                     | 0,26                     | 6            | 1,029    |
|                            | 400                     | 0,15                     | 6            | 0,915    |
| MSSA12                     | 0                       | 0,32                     | 3            | 1,243    |
|                            | 200                     | ND                       | 8            | 0,845    |
|                            | 400                     | -                        | >28          | 0,441    |
| MSSA14                     | 0                       | 0,18                     | 6            | 1,126    |
|                            | 200                     | ND                       | >8           | 0,786    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 0,396    |
| MSSA29                     | 0                       | 0,25                     | 4            | 1,265    |
|                            | 200                     | 0,16                     | >6           | 0,765    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 0,650    |
| <i>S. aureus</i> ATCC25923 | 0                       | 0,12                     | 1            | 1,301    |
|                            | 200                     | ND                       | 8            | 1,242    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 1,234    |

(ND) = Não determinado.

(-) Não houve crescimento.

Para as linhagens MSSA, o aumento máximo observado na duração da fase lag foi de até 48 h para concentrações maiores da bacteriocina. Concentrações menores aumentaram em pelo menos 2 h a duração da fase lag (Tabela 5). A cepa padrão *S. aureus* ATCC25923 teve a menor duração da fase lag na ausência da bacteriocina e a taxa de crescimento ficou em 0,12 h<sup>-1</sup> com a DO máxima observada de 1,301 (Tabela 5).

Para a linhagem MSSA09, em que a bacteriocina teve menor efeito na duração da fase lag, concentrações de 400UI/mL da bacteriocina resultaram em diminuição de até 50% na taxa de crescimento (Tabela 5).

Para as linhagens MRSA (Tabela 6), 1600 UI/mL inibiram completamente o crescimento e concentrações iguais a 400 UI/mL aumentaram a duração da fase lag em mais de 8 h, dificultando a obtenção de pontos suficientes na fase logarítmica de crescimento para realização dos cálculos necessários. O valor máximo de DO atingido na presença da nisina foi 0.553 e de 0,876 na ausência da mesma. A duração da fase lag foi de no mínimo uma hora, para concentrações menores e maior que 48 horas para concentrações maiores da bacteriocina. A taxa de crescimento variou entre 0,17 a 0,24 h<sup>-1</sup>. Para o controle *S. aureus* ATCC33591 a taxa de crescimento foi de 0,30 e a DO máxima observada foi de 0.960 (Tabela 6).

**Tabela 6:** Efeito da nisina nos parâmetros de crescimento de linhagens de MRSA.

| Linagem                    | Bacteriocina<br>(UI/mL) | $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) | Fase Lag (h) | D.O. máx |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|----------|
| MRSA03                     | 0                       | 0.21                     | 2            | 0,876    |
|                            | 400                     | ND                       | > 8          | 0,553    |
|                            | 1600                    | -                        | > 48         | 0,062    |
| MRSA04                     | 0                       | 0,17                     | 1            | 0,798    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 0,506    |
|                            | 1600                    | -                        | >48          | 0,060    |
| MRSA05                     | 0                       | 0.24                     | 2            | 0,784    |
|                            | 400                     | ND                       | > 8          | 0,369    |
|                            | 1600                    | -                        | > 48         | 0,080    |
| MRSA06                     | 0                       | 0.24                     | 1            | 0,648    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 0,367    |
|                            | 1600                    | -                        | >48          | 0,060    |
| MRSA07                     | 0                       | 0.23                     | 1            | 0,768    |
|                            | 400                     | ND                       | >8           | 0,458    |
|                            | 1600                    | -                        | >48          | 0,090    |
| <i>S. aureus</i> ATCC33591 | 0                       | 0.30                     | 1            | 0,960    |
|                            | 400                     | ND                       | >48          | 0,052    |
|                            | 1600                    | -                        | >48          | 0,069    |

(ND) = Não determinado.

(-) Não houve crescimento.

A fase lag é um período de preparação da célula para crescer na condição em que se encontra. Essa fase será mais curta se as condições de crescimento forem ótimas. Entretanto, a presença de agentes antimicrobianos ou fatores físicos desfavoráveis podem prolongar esse período, fazendo com que a célula demore a crescer e também com que atinja uma população final menor (TORTORA *et al.*, 2012). Esta estratégia é muito utilizada pela indústria de alimentos para aumentar o prazo de prateleira dos produtos e, no caso de doenças infecciosas, pode ser uma estratégia para diminuir o crescimento do patógeno e assim os danos causados por eles no organismo (GOPAL *et al.*, 2015; MEZARROBA *et al.*, 2016; FIELD *et al.*, 2016). Um aumento na fase lag pode levar também a diminuição da velocidade específica de crescimento, que corresponde à variação de células no tempo. Consequentemente, a célula vai crescer menos em um mesmo intervalo de tempo e a população final de células será menor.

Estes resultados combinado aos anteriores comprovam a eficiência da nisina em controlar o crescimento de *Staphylococcus aureus* seja ele sensível ou resistente a meticilina.

## **5.5 Seleção de linhagens de MRSA e MSSA resistentes a nisina**

As linhagens utilizadas no ensaio anterior foram submetidas ao teste de seleção de linhagens resistentes à bacteriocina. As culturas foram transferidas na presença de doses subletais da bacteriocina e a atividade da nisina para as linhagens de MSSA e MRSA testadas foi diminuindo a cada transferência (Tabela 7, Tabela 8). Independente da atividade inicial da bacteriocina, após 30 transferências todas as linhagens de MSSA demonstraram uma mesma atividade: 160 UA/mL, com exceção da linhagem MSSA12 e da cepa padrão *S. aureus* ATCC25923, que perdeu completamente a sensibilidade a bacteriocina a partir da 25ª transferência (Tabela 7). O aumento na CIM destas culturas de MSSA, que variou de 8 a 255 vezes, confirmou a diminuição da sensibilidade das linhagens à nisina (Tabela 3 e 7).

Uma observação interessante foi feita em relação à linhagem MSSA12, que perdeu completamente a sensibilidade a bacteriocina no teste de difusão em ágar, entretanto apresentou um menor aumento na CIM (Tabela 7). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que vários fatores podem interferir no método de difusão em ágar (OSTROSKY *et al.*, 2008), como já descrito anteriormente. Portanto, o método de difusão serviu para monitorar a sensibilidade das linhagens à bacteriocina, mas a determinação da CIM pelo método de microdiluição é necessária para confirmar o resultado final. Mesmo assim, este resultado e os

das demais linhagens, demonstram que as mesmas sofreram uma adaptação à bacteriocina nisina após sucessivas exposições.

**Tabela 7:** Efeito da nisina na seleção de linhagens de MSSA resistentes a bacteriocina. As linhagens foram transferidas sucessivamente na presença de dose subletal da bacteriocina e a atividade em unidades arbitrárias (UA) foi determinada. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 2)

| Nº de<br>transferência | Atividade da bacteriocina (UA/mL) |          |        |          |        |        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|----------|--------|----------|--------|--------|-----------------------------------|
|                        | MSSA02                            | MSSA07   | MSSA09 | MSSA12   | MSSA14 | MSSA29 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>25923 |
| 0                      | 2560                              | 2560     | 1280   | 640      | 640    | 640    | 1280                              |
| 5                      | 1280                              | 640      | 640    | 320      | 640    | 320    | 640                               |
| 10                     | 1280                              | 320      | 640    | 320      | 640    | 320    | 320                               |
| 15                     | 1280                              | 320      | 640    | 320      | 320    | 320    | 160                               |
| 20                     | 1280                              | 160      | 320    | 160      | 320    | 320    | 80                                |
| 25                     | 320                               | 160      | 320    | 0        | 320    | 320    | 0                                 |
| 30                     | 160                               | 160      | 160    | 0        | 160    | 160    | 0                                 |
| CIM 2 (UI/mL)          | >25000                            | 15000±0* | >50000 | 10000±0* | >25000 | >50000 | >25000                            |

Para as linhagens MRSA, a partir da 25ª transferência não foi observado halo de inibição para nenhuma das linhagens (Tabela 8). Esse resultado pode ser explicado pelo fato destas linhagens apresentarem valores maiores de CIM da bacteriocina e também, como já mencionado, resistência a meticilina pode, de alguma forma, diminuir a sensibilidade das linhagens a nisina. O aumento no valor da CIM para todas as linhagens MRSA incluindo a cepa padrão *S. aureus* ATCC33591 foi superior a 90%, confirmando o fenótipo de resistência à bacteriocina (Tabela 4 e 8).

**Tabela 8.** Efeito da nisina na seleção de linhagens de MRSA resistentes a bacteriocina. As linhagens foram transferidas sucessivamente na presença de dose subletal da bacteriocina e a atividade em unidades arbitrárias (UA) foi determinada. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 2)

| Nº de<br>transferência | Atividade da bacteriocina (UA/mL) |        |        |        |        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------------|
|                        | MRSA03                            | MRSA04 | MRSA05 | MRSA06 | MRSA07 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>33591 |
| 0                      | 1280                              | 640    | 1280   | 1280   | 1280   | 2560                              |
| 5                      | 320                               | 320    | 640    | 320    | 640    | 1280                              |
| 10                     | 320                               | 320    | 320    | 160    | 320    | 320                               |
| 15                     | 160                               | 160    | 160    | 160    | 160    | 320                               |
| 20                     | 0                                 | 0      | 160    | 0      | 0      | 80                                |
| 25                     | 0                                 | 0      | 0      | 0      | 0      | 0                                 |
| CIM 2 (UI/mL)          | >25000                            | >25000 | >25000 | >25000 | >25000 | >25000                            |

De acordo com Collins *et al.* (2012), os mecanismos envolvidos na resistência à bacteriocina podem ser divididos em dois grupos: resistência adquirida (desenvolvida por uma cepa anteriormente susceptível) e resistência inata (que intrinsecamente encontrada em gêneros ou espécies particulares). Estudos mostram que resistência adquirida a bacteriocinas, de uma maneira geral, está relacionada a alteração fisiológica em virtude da exposição a baixas concentrações do peptídeo, funcionando como uma resposta adaptativa da célula (FIELD *et al.*, 2016; MASIAS *et al.*, 2017). Mecanismos como alteração no conteúdo lipídico e fluidez da membrana citoplasmática, na carga ou espessura da parede celular e até na expressão de transportadores ABC tem sido relacionados à resistência a bacteriocinas (MANTOVANI & RUSSEL, 2001; KAWADA-MATSUO *et al.*, 2013). Especificamente para *S. aureus*, resistência a nisina foi descrita como relacionada a sistemas regulatórios de 2 componentes que regulam a expressão de transportadores ABC (KAWADA-MATSUO *et al.*, 2013).

Alterações fisiológicas são facilmente revertidas através de mudanças ambientais. Portanto, para avaliar se a resistência destas linhagens a bacteriocina é um fenótipo reversível,

tratando-se apenas de uma adaptação fisiológica, as linhagens foram novamente transferidas sucessivamente em meio de cultura, só que sem a bacteriocina. Para algumas linhagens MSSA houve aumento na atividade da nisina após a 10ª transferência na ausência da bacteriocina. Entretanto, na 20ª transferência não foi mais observada a formação de halo de inibição ou a atividade da bacteriocina foi igual ou menor em relação à transferência 0 (Tabela 9).

**Tabela 9.** Estabilidade do fenótipo de resistência a nisina por MSSA. Linhagens de MSSA resistentes a bacteriocina foram transferidas sucessivamente na ausência da nisina e a atividade em unidades arbitrarias/mL (UA/mL) foi testada após a 0, 10 e 20ª transferência. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 3)

| Número da transferência | Atividade da bacteriocina (UA/mL) |        |        |        |        |        |                             |
|-------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------|
|                         | MSSA02                            | MSSA07 | MSSA09 | MSSA12 | MSSA14 | MSSA29 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
| 0                       | 160                               | 160    | 160    | 0      | 160    | 160    | 80                          |
| 10                      | 320                               | 320    | 160    | 0      | 320    | 320    | 320                         |
| 20                      | 0                                 | 160    | 80     | 0      | 0      | 0      | 160                         |
| CIM 3 (UI/mL)           | >25000                            | >25000 | >50000 | >25000 | >25000 | >50000 | >25000                      |

Após essas transferências, a CIM das linhagens (CIM3) atingiram valores superiores a 25000 UI/mL da nisina, não ocorrendo diminuição quando comparado as CIM2, confirmando assim o fenótipo de resistência a nisina. O mesmo resultado foi observado para a cepa padrão *S. aureus* ATCC25923 (Tabela 9). Estes resultados confirmam que o fenótipo de resistência à bacteriocina em MSSA é estável, podendo se tratar de uma alteração genotípica.

As linhagens de MRSA também tiveram o mesmo comportamento observado para as linhagens MSSA. Neste caso o aumento da atividade da bacteriocina foi de 0 para 160 ou 320 UA/mL após a 10ª transferência dependendo da linhagem (Tabela 10). Entretanto, após a 20ª transferência na ausência da bacteriocina não foi mais detectada a formação de halo de inibição para a nisina contra as linhagens, exceto para MRSA07 e a cepa padrão *S. aureus* ATCC33591 que diminuiu pela metade o valor da sua atividade. Estes resultados, assim como para as linhagens MSSA, confirmam que o fenótipo de resistência à nisina é estável, podendo

estar associado a um fator genotípico. A determinação da CIM3 confirmou a resistência das linhagens à bacteriocina (Tabela 10).

**Tabela 10.** Estabilidade do fenótipo de resistência a nisina por MRSA. Linhagens de MRSA resistentes a bacteriocina foram transferidas sucessivamente na ausência da nisina e a atividade em unidades arbitrárias/mL (UA/mL) foi testada após a 0, 10 e 20ª transferência. A concentração inibitória mínima após a transferência final (CIM 3)

| Número da transferência | Atividade da bacteriocina (UA/mL) |        |        |        |        |                                |
|-------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------------------------------|
|                         | MRSA03                            | MRSA04 | MRSA05 | MRSA06 | MRSA07 | <i>S. aureus</i><br>ATCC33.591 |
| 0                       | 0                                 | 0      | 0      | 0      | 0      | 0                              |
| 10                      | 160                               | 160    | 160    | 160    | 320    | 320                            |
| 20                      | 0                                 | 0      | 0      | 0      | 160    | 160                            |
| CIM 3 (UI/mL)           | >25000                            | >25000 | >25000 | >25000 | >25000 | >25000                         |

Blake e colaboradores (2011), constataram que mutação em uma proteína histidina cinase estava relacionada à resistência a nisina em *S. aureus*. Comparação na sequência de bases nitrogenadas do gene codificante desta proteína entre espécies sensíveis e resistentes a nisina demonstraram alteração em alguns pares de base. Além disso, estes autores constataram que essa alteração teve pouco impacto no crescimento do microrganismo e tornou-se um fenótipo estável mesmo na ausência da bacteriocina, como observado nos resultados obtidos no presente estudo.

Apesar dos nossos resultados mostrarem que resistência a nisina é um fenótipo estável, até o presente momento, apenas testes *in vitro* demonstraram adaptação à bacteriocina. Considerando que bacteriocinas ainda não foram usadas na mesma escala que os antibióticos, ainda não existe uma população resistente a bacteriocina para ser selecionada. Algumas bacteriocinas, como os lantibióticos, incluindo a nisina, possuem um duplo mecanismo de ação não compartilhado por outros compostos terapêuticos em uso, o que reduz a probabilidade de seleção de cepas resistentes (VAN HEEL *et al.*, 2011). Entretanto, estes resultados indicam que antes do uso terapêutico de bacteriocinas, seria interessante desenvolver estratégias para evitar no futuro o problema atual de resistência a antibióticos. A

melhor maneira de usar bacteriocinas terapeuticamente talvez seja em combinação com antibióticos tradicionais, alguns estudos ainda relatam parar de utilizar a nisina como conservante alimentar.

## **5.6 Análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de linhagens sensíveis e resistentes a bacteriocina**

Alguns autores enfatizam que resistência a bacteriocinas pode alterar o perfil de sensibilidade a antibióticos de linhagens bacterianas (KAUR *et al.*, 2014). Entretanto, especificamente para *S. aureus*, como já descrito anteriormente, Blake e colaboradores (2011), constataram que resistência a nisina não alterou o perfil de sensibilidade a antibióticos nessa espécie de microrganismo. Para uma linhagem ser considerada como MRSA ela deve apresentar resistência a cefoxitina (CFO) e oxacilina (OXA), porém a utilização da CFO como referência para resistência a metilicina se dá pelo fato desta possuir maior capacidade de indução na expressão da PBP2a do que a OXA (URDANGARIN *et al.*, 2011). Para testar essa possibilidade, o perfil de sensibilidade das linhagens de MSSA e MRSA a antibióticos (Tabela 2, pg 30) foi testado em três situações: antes da transferência na presença da bacteriocina, após a transferência na presença da bacteriocina e após transferência das linhagens resistentes a nisina na ausência da bacteriocina (Tabela 11 e 12).

Nas linhagens de MSSA o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos variou nas linhagens submetidas às três condições de transferência. Dentre todas as linhagens os antimicrobianos que tiveram maior variação com relação ao seu halo de inibição foram: CFO e OXA (Tabela 11 e 12). Para o antibiótico oxacilina, foi observado redução no diâmetro do halo de inibição para as linhagens MSSA09 e MSSA14 após transferência na presença da nisina. Estas linhagens apresentavam sensibilidade a OXA e após contato com a nisina tornaram-se resistentes ao agente antimicrobiano (Tabela 11). Para a CFO o mesmo padrão foi observado nas linhagens MSSA07, MSSA09, MSSA14 e a cepa padrão *S. aureus* ATCC25923, todas apresentaram resistência ao antimicrobiano após transferência na presença da nisina. Com relação a eritromicina a linhagem MSSA07 tinha halo intermediário e passou a ser sensível, bem como a MSSA02 para a GEN. A linhagem MSSA09 antes do contato com a nisina apresentava sensibilidade a ERI e após contato, com a bacteriocina, a medida do seu halo passou de 23 pra 8 mm, tornando-se resistente (Tabela 11). As linhagens não

apresentaram alterações no perfil de sensibilidade quando avaliados os antibióticos CLI e CIP, e a linhagem MSSA29 não teve alteração para nenhum antibiótico. O mais curioso foi que as linhagens MSSA07, MSSA09, MSSA14 e a cepa controle padrão *S. aureus* ATCC25923, apresentaram resistência a cefoxitina e as linhagens MSSA09 e MSSA14 a oxacilina depois de terem sido expostas à bacteriocina, tornando-se assim MRSA (Tabela 11).

Analisando as linhagens MRSA foram observadas alterações no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos CFO, OXA, CLI e ERI. Todas as linhagens com exceção da MRSA06 e a cepa padrão *S. aureus* ATCC33591, apresentaram resistência a ERI. O antimicrobiano CIP e GEN foram os únicos que não apresentaram nenhuma alteração no perfil de sensibilidade dentre todas as linhagens estudadas. Em relação à sensibilidade a CFO, todas as linhagens, com exceção da MRSA04 continuaram sensíveis ao antimicrobiano após a transferência na presença da nisina, mantendo, portanto, o fenótipo de sensibilidade a metilina (Tabela 12). Quando as linhagens foram submetidas a transferência na ausência da nisina, todas elas incluindo a MRSA04 apresentaram resistência a bacteriocina. O mesmo não ocorreu para a linhagem MRSA03 que apresentou sensibilidade a CFO, tornando-se assim uma MSSA (Tabela 12).

**Tabela 11:** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de MSSA, antes da transferência na presença da nisina (S1), após a transferência na presença da nisina (S2) e após transferência na ausência (S3). O resultado é apresentado em milímetros de halo de inibição

| Antimicrobiano                 |    | CFO | CLI | OXA | ERI | CIP | GEN |
|--------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Linhagem                       |    |     |     |     |     |     |     |
| MSSA02                         | S1 | 29  | 25  | 26  | 25  | 23  | 13  |
|                                | S2 | 33  | 26  | 28  | 24  | 23  | 17  |
|                                | S3 | 31  | 29  | 26  | 25  | 25  | 21  |
| MSSA07                         | S1 | 31  | 23  | 17  | 21  | 24  | 18  |
|                                | S2 | 29  | 23  | 18  | 22  | 21  | 15  |
|                                | S3 | 19  | 27  | 14  | 24  | 26  | 20  |
| MSSA09                         | S1 | 29  | 24  | 16  | 23  | 25  | 19  |
|                                | S2 | 32  | 25  | 19  | 22  | 25  | 14  |
|                                | S3 | 17  | 27  | 08  | 08  | 26  | 21  |
| MSSA12                         | S1 | 33  | 30  | 18  | 27  | 26  | 22  |
|                                | S2 | 28  | 20  | 21  | 21  | 23  | 20  |
|                                | S3 | 29  | 25  | 19  | 24  | 29  | 21  |
| MSSA14                         | S1 | 40  | 24  | 29  | 23  | 22  | 20  |
|                                | S2 | 29  | 24  | 26  | 24  | 23  | 19  |
|                                | S3 | 17  | 27  | 08  | 24  | 25  | 21  |
| MSSA29                         | S1 | 29  | 24  | 24  | 04  | 22  | 20  |
|                                | S2 | 31  | 25  | 29  | 20  | 24  | 19  |
|                                | S3 | 30  | 26  | 24  | 09  | 24  | 20  |
| <i>S. aureus</i><br>ATCC25.923 | S1 | 31  | 24  | 26  | 22  | 25  | 20  |
|                                | S2 | 30  | 28  | 24  | 23  | 25  | 20  |
|                                | S3 | 15  | 29  | 24  | 25  | 26  | 22  |

CFO= Cefoxitina. CLI= Clidamicina. OXA= Oxacilina. ERI= Eritromicina. CIP= Ciprofloxacina. GEN= Gentamicina.  
ATCC25.93 = Cepa padrão MSSA.

**Tabela 12:** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as linhagens de MRSA, antes da transferência na presença da nisina (S1), após a transferência na presença da nisina (S2) e após transferência na ausência (S3). O resultado é apresentado em milímetros de halo de inibição.

| Antimicrobiano                 |    | CFO | CLI | OXA | ERI | CIP | GEN |
|--------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Linhagem                       |    |     |     |     |     |     |     |
| MRSA03                         | S1 | 21  | 27  | 04  | 26  | 26  | 21  |
|                                | S2 | 20  | 24  | 15  | 20  | 25  | 16  |
|                                | S3 | 28  | 21  | 19  | 09  | 25  | 20  |
| MRSA04                         | S1 | 19  | 24  | 04  | 26  | 24  | 20  |
|                                | S2 | 22  | 26  | 18  | 23  | 24  | 16  |
|                                | S3 | 12  | 24  | 08  | 08  | 24  | 20  |
| MRSA05                         | S1 | 18  | 24  | 04  | 23  | 25  | 20  |
|                                | S2 | 20  | 26  | 17  | 24  | 25  | 20  |
|                                | S3 | 13  | 27  | 08  | 08  | 23  | 20  |
| MRSA06                         | S1 | 14  | 26  | 04  | 22  | 23  | 14  |
|                                | S2 | 20  | 24  | 16  | 21  | 21  | 17  |
|                                | S3 | 19  | 23  | 08  | 22  | 23  | 18  |
| MRSA07                         | S1 | 16  | 26  | 04  | 23  | 24  | 21  |
|                                | S2 | 20  | 28  | 14  | 23  | 25  | 20  |
|                                | S3 | 17  | 25  | 09  | 09  | 25  | 19  |
| <i>S. aureus</i><br>ATCC33.591 | S1 | 04  | 04  | 04  | 04  | 27  | 16  |
|                                | S2 | 20  | 24  | 16  | 22  | 20  | 16  |
|                                | S3 | 19  | 25  | 08  | 09  | 24  | 20  |

CFO= Cefoxitina. CLI= Clidamicina. SUT= Sulfametoxazol. OXA= Oxacilina. ERI= Eritromicina. CIP= Ciprofloxacina. GEN= Gentamicina.  
ATCC33.591 = Cepa padrão MRSA.

O fato de algumas linhagens dentre as MSSA apresentarem resistência aos antimicrobianos, principalmente CFO e OXA, após o contato com a nisina, pode ser explicado pelo fenômeno de resistência cruzada entre bacteriocinas e antibióticos, como descrito por alguns autores, porém apenas alguns estudos abordaram de forma abrangente esta questão (KAUR *et al.*, 2014). Martínez e colaboradores (2005), relatou a presença de resistência cruzada entre a nisina e os antibióticos kanamicina, estreptomicina e a polimixina B, apenas em linhagens de *L. monocytogenes* do tipo selvagem o qual pode está associado ao desenvolvimento do fenótipo de resistência a nisina. Porém o resultado de resistência cruzada entre a nisina e a polimixina B parece ser explicado pelo fato de que a bacteriocina compartilha o mesmo alvo primário do que o agente antimicrobiano citado. Entretanto, ainda não foram descritos estudos que mostrem a existência da resistência cruzada entre a nisina e a meticilina. O fato do gene *mecA* não ter sido detectado nas linhagens MSSA que se tornaram resistentes a meticilina, indica que resistência a este antimicrobiano nestas linhagens pode estar relacionada a outro mecanismo ainda não elucidado. Portanto este ponto será melhor investigado em trabalhos futuros.

Estes resultados apontam que a utilização da nisina pode desencadear resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos. Para a utilização da nisina para fins terapêuticos, este ponto deve ser cuidadosamente investigado para evitar problemas futuros, como, por exemplo, investigar mecanismos de resistência e formas de anulá-los. Estudos posteriores mais detalhados serão realizados para investigar os determinantes genéticos envolvidos nesse processo, através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento genético das linhagens de MSSA e MRSA resistente e sensível a nisina.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos confirmaram genotipicamente resistência a meticilina nas linhagens MRSA e que as mesmas são de origem humana e associadas a ambientes comunitários. Os testes de sensibilidade demonstraram que as linhagens de MSSA e MRSA testadas apresentam perfis variados de sensibilidade em relação a CIM e DBM e que a nisina possui potencial para controlar o crescimento destas linhagens, exercendo atividade bactericida contra a maioria delas.

Entretanto, quando em contato com dose subletal da nisina, as linhagens de MSSA e MRSA apresentaram resistência a bacteriocina, que demonstrou ser um fenótipo estável. Além disso, resistência a bacteriocina também alterou o perfil de sensibilidade destas linhagens a alguns antibióticos, indicando que resistência à nisina pode desencadear resistência cruzada a outros agentes antimicrobianos. Portanto, para utilização da nisina para fins terapêuticos, este ponto deve ser cuidadosamente investigado para evitar problemas futuros, como, por exemplo, investigar mecanismos de resistência e formas de anulá-los. Estudos posteriores mais detalhados serão realizados para investigar os determinantes genéticos envolvidos nesse processo.

A melhor maneira de usar bacteriocinas terapeuticamente talvez seja em combinação com antibióticos tradicionais, com mecanismos de ação distintos.

## REFERENCIAS

- ABDALLAH, E. **Medicinal plants as an alternative drug against methicillin resistant *Staphylococcus aureus***. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 3, n. 31, p. 35-42, 2016.
- AHMAD, V., KHAN, M., JAMAL, Q., ALZOHAIRY, M., AL KARAAWI, M., *et al.* **Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation**. The International Journal of Food Microbiology, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016.
- ALEGRIA, A., DELGADO, S., ROCES, C., LOPEZ, B., MAYO, B. **Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-freecheeses made of raw milk**. The International Journal of Food Microbiology, v. 143, n. 1, p. 61-66, 2010.
- ALLEN, H. K., TRACHSEL, J., LOOFT, T., CASEY, T. A. **Finding alternatives to antibiotics**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1323, n. 1, p. 91-100, 2014. DOI 10.1111/nyas.12468.
- ARAUZ, L. J., JOZALA, A. F., BARUQUE-RAMOS, J., MAZZOLA, P. G., PESSOA, A., PENNA, T. C. V. **Culture médium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations**. Annals of Microbiology, v. 62, n. 1, p. 419-426, 2012. DOI 10.1007/s13213-011-0278-6.
- ASKARIAN, F., UCHIYAMA, S., VALDERRANA, J., AJAYI, C., SOLLID, J., *et al.* **Serine-Aspartate Repeat Protein D Increases *Staphylococcus aureus* Virulence and Survival in Blood**. Infection and immunity, v. 85, n. 1, 2017. DOI 10.1128/IAI.00559-16.
- AUNPAD, R., KAEWKLOM, S. **A novel bacteriocin with anti-MRSA activity produced by *B. amyloliquefaciens* strain WARY9-1M and its characterization**. Journal of Pure and Applied Microbiology, v. 7, n. 4, p. 2591-2596, 2013.
- BALCIUNAS, E. M., MARTINEZ, F. A., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. M., CONVERTO, A., OLIVEIRA, R. P. S. **Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review**. Food Control, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.
- BASTOS, V., NORBERG, A., OLIVEIRA, J., SANCHES, F., JUNIOR, O., SERRA-FREIRE, N. **Comparação da incidência, da prevalência da colonização e da resistência de *Staphylococcus aureus* em diferentes populações humanas**. Revista Uniabeu, v.6, n. 13, p. 28-40, 2013.
- BAUER, P., SAMPATHKUMAR, P. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in ICU: what is the best prevention strategy?** Critical Care Medicine, v.45, n. 8, p. 1413-1414, 2017. DOI 10.1097/CCM.0000000000002516.
- BENDEJEDDOU, K., FONS, M., STROCKER, M., SADOUN, D. **Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 4, p. 1543-1552, 2012. DOI 10.1007/s11274-011-0958-1.

BEHRENS, H., SIX, A., WALKER, D., KLEANTHOUS, C. **The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics.** *Emerging Topics in Life Sciences*, v. 1, n. 1, p. 65-74, 2017. DOI 10.1042/ETLS20160016.

BHAT, G., KUMARI, J., SHENOY, S., MAHABALA, C., KATARA, V. **In vitro activity of vancomycin and daptomycin against healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens.** *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 9, n. 3, p. 44-46, 2016.

BHATIJA, S., BHARTI, A. **Evaluating the antimicrobial activity of nisin, lysozyme and ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film.** *The Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n.6, p. 3504-3512, 2014. DOI 10.1007/s13197-014-1414-7.

BHATTACHARYA, S., BIR, R., MAJUMDAR, T. **Evaluation of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* and their Association with Biofilm Production in a Tertiary Care Hospital, Tripura, Northeast India.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 9, 2015. DOI 10.7860/JCDR/2015/13965.6417.

BIBALAN, M., ESHAGHI, M., ROHANI, M., POURSHAFIE, M., TALEBI, M. **Determination of Bacteriocin Genes and Antibacterial Activity of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fecal of Healthy Individuals.** *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, v. 6, n. 1, p. 50-55, 2017. DOI 10.22088/acadpub.BUMS.6.1.50.

BIRRI, D., BREDE, D., NES, I. **Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 402-410, 2012. DOI 10.1128/AEM.06588-11.

BLAKE, K., RANDALL, C., O'NEILL, A. **In Vitro Studies Indicate a High Resistance Potential for the Lantibiotic Nisin in *Staphylococcus aureus* and Define a Genetic Basis for Nisin Resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 2362-2368, 2011. DOI 10.1128/AAC.01007-10.

BLAKE, K., O'NEILL, A. **Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 12-16, 2013. DOI 10.1093/jac/dks373.

BLEIZIFFER, I., EIKMEIER, J., POHLENTZ, G., MCAULAY, K., XIA, G., *et al.* **The Plasmin-Sensitive Protein Pls in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Is a Glycoprotein.** *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 1, 2017. DOI 10.1371/journal.ppat.1006110.

BODNAR, G., MARTINS, H., FERREIRA, O. C., MOREY, A., TAVARES, E., *et al.* **Comparison of HRM analysis and three REP-PCR genomic fingerprint methods for rapid typing of MRSA at a Brazilian hospital.** *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, n. 12, p. 1306-1317, 2016. DOI 10.3855/jidc.7887.

BONINI, M., NETO, J., MARINGONI, A. **Produção e sensibilidade de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à bacteriocinas.** *Summa Phytopatologica*, v. 38, n. 3, p. 232-234, 2012.

BORDIGNON-JUNIOR, S., MIYAOKA, M., COSTA, J., BENAVENTE, C., COUTO, G., SOCCOL, C. **Inhibiting gram-negative bacteria growth in microdilution by nisin and EDTA treatment.** Journal of Biotechnology, v. 3, n. 4, p. 127-135, 2012.

BROWN, L., SMITH, C., BOWDEN, G. **Identification of a T-cell epitope in the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine LukS-PV component.** Open Journal of Immunology, v. 2, n. 3, p. 111, 2012.

CALFEE, D. P. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci and other gram-positive in healthcare.** Current Opinion in Infectious Diseases, v. 25, n. 4, p. 385-394, 2012.

CASTRO, A., PALHAU, C., CUNHA, S., CAMARINHA, S., SILVA, J., *et al.* **Virulence and resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from food.** Acta Alimentaria, v. 46, n. 2, p. 231-237, 2017. DOI 10.1556/066.2017.46.2.13.

CATÃO, R., SILVA, P., FEITOSA, R., PIMENTEL, M., PEREIRA, H. **Prevalência de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.** Revista Brasileira de Enfermagem, v. 7, n. 8, p. 8257-5264, 2013. DOI 10.5205/reuol.3452-28790-4-ED.0708201325.

CAVERA, V., ARTHUR, T., KASHTANOV, D., CHIKINDAS, M. **Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics.** The International Journal of Antimicrobial Agents, v. 45, n. 5, p. 494-501, 2015.

CEBRIÁN, R., ARÉVALO, S., ANANOU, S., ARIAS-SANTIAGO, S., RIAZZO, C., ROJO, M.D., *et al.* **The potential of bacteriocin AS-48 in the control of *Propionibacterium acnes*.** PeerJ PrePrints, v. 2107, n. 4, p. 1-23, 2017.

Center for Disease Control and Prevention. **Morbidity And Mortality Weekly Report, 2015.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/index2015.html>> Acesso em: 6 de ago. 2017.

CHMIELARCZYK, A., POMORSKA-WESOŁOWSKA, M., SZCZUPTA, A., ROMANISZYN, D., POBIEGA, M., *et al.* **Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from different types of infections from patients hospitalized in 12 regional, non-teaching hospitals in southern Poland.** The Journal of Hospital Infection, 2016. DOI 10.1016/j.jhin.2016.10.024.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S26.** v. 25, n. 1, 180p., 2017.

COLLINS, B., GUINANE, C., COTTER, P., HILL, C., ROSS, R. **Assessing the contributions of the LiaS histidine kinase to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, cephalosporins and disinfectants.** Applied and Environmental Microbiology, 2012.

COLLINS, F., O'CONNOR, P., O'SULLIVAN, O., GÓMEZ-SALA, B., REA, M., *et al.* **Bacteriocin gene-trait matching across the complete *Lactobacillus* pan-genome.** Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 3481, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-03339-y.

COOKE, J., BROWN, M. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.** British Medical Bulletin, v. 94, p. 215-227, 2010.

COSTA, A. L. P., JUNIOR, A. S. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura.** Estação Científica (UNIFAP), v. 7, n. 2, p. 45. DOI 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews: Microbiology*, v. 3, p. 777-788, 2005. DOI 10.1038/nrmicro1240.

COTTER, P. D., ROSS, R.P., HILL, C. **Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics?** *Nature Reviews. Microbiology*, v. 11, p. 95-105, 2013. DOI 10.1038/nrmicro2937.

DAWSON, M. J., SCOTT, R. W. **New horizons for host defense peptides and lantibiotics.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 12, p. 545-550, 2012. DOI 10.1016/j.coph.2012.06.006.

DIAS, A. P. M., PINHEIRO, M. G., ALVES, F. A. **Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*.** *Acta Scientiarum Technology*, v. 3, n. 1, p. 9-23, 2015.

DIAS-SOUZA, M., SANTOS, R., CERÁVOLO, I., COSENZA, G., MARÇAL, P., *et al.* **Euterpe oleracea pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs.** *Microbial Pathogenesis*, v. 114, p. 29-35, 2018. DOI 10.1016/J.MICPATH.2017.11.006.

DIEZ, M., MARTINEZ, S., MIRONES, C., ACOSTA, F., ICARDO, J., *et al.* **Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms.** *Plos One*, v. 11, n. 1, 2016.

DI PIERRO, F., ZANVIT, A., NOBILI, P., RISSO, P., FORMAINI, C., *et al.* **Cariogram outcome after 90 days of oral treatment with *Streptococcus salivarius* M18 in children at high risk for dental caries: results of a randomized controlled study.** *Clinical Cosmetic and Investigational Dentistry*, v. 7, p. 107-113, 2015. DOI 10.2147/CCIDE.S9366.

DOSLER, S., GERCEKER, A. **In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* strains.** *Chemotherapy*, v. 57, p. 511-516, 2011.

DRAPER, L., COTTER, P., HILL, C., ROSS, R. **Lantibiotic Resistance.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 2, p. 171-191, 2015.

ENRIGHT, M., ROBINSON, A, RANDLE, G., FEIL, E., GRUNDMANN, H., SPRATT, B. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** *PNAS*, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002. DOI 10.1073/pnas.122108599.

ESCANO, J., STAUFFER, B., BRENNAN, J., BULLOCK, M., SMITH, L. **Biosynthesis and transport of the lantibiotic mutacin 1140 produced by *Streptococcus mutans*.** *Journal of Bacteriology*, v. 197, n. 7, p. 1173-1184, 2015.

FIELD, D., O' CONNOR, R., COTTER, P., ROSS, R., HILL, C. **In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 558, 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.00508.

FIELD, D., SEISLING, N., COTTER, P., ROSS, R., HILL, C. **Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1713, 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.01713.

FRANÇOIS, P., SCHERL, A., Hochstrasser, D., SCHERENZEL, J. **Proteomic approach to investigate pathogenicity and metabolism of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Protocol Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) protocols, v.1085, p. 231-250, 2013.

GARCIA-ALVAREZ, L., HOLDEN, M., T., LINDSAY, H., WEBB, C., R., BROWN, D., F., *et al.* **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.** Lancet Infectious Diseases, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011. DOI 10.1016/S1473-3099(11)70126-8.

GOPAL, N., HILL, C., ROSS, P., BERESFORD, T., FENELON, M., *et al.* **The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry.** Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 1417, 2015. DOI 10.3389/fmicb.2015.01418.

GRILLO, V., GONÇALVES, T., JÚNIOR, J., PANIÁGUA, N., TELES, C. **Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

GUILLET, C., KOLLEF, M. **Does this patient have... Is this patient at risk for infection with multidrug-resistant bacteria?** Internacional Care Medicine, v. 43, n. 3, p. 436-439, 2017. DOI 10.1007/s00134-015-4126-1.

HADLER J., PETIT S., MANDOUR M., CARTTER M. **Trends in invasive infection with methicillin-resistant staphylococcus aureus, Connecticut, USA, 2001-2010.** Emerging Infectious Diseases, v. 18, n. 6, p. 917-924, 2012. DOI 10.3201/eid1806.120182.

HAGRAS, M., HEGAZY, Y., ELKABANNY, A., MOHAMMAD, H., GHIATY, A., *et al.* **Biphenylthiazole antibiotics with an oxadiazole linker: An approach to improve physicochemical properties and oral bioavailability.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 143, p. 1448-1456, 2018. DOI 10.1016/J.EJMECH.2017.10.048.

HASSAN, M., KJOS, M., NES, I. F., DIEP, D. B., LOFTIPOUR, F. **Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potencial applications to fight against antibiotic resistance.** Journal of Applied Microbiology, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.

HEMERT, S., *et al.* **Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells.** BMC Micro, v. 10, n. 1, p. 293, 2010.

HEUNIS, D., SMITH, C., DICKS, M. **Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 3928-3935, 2013.

HOOVER D., HARLANDER S. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Elsevier, p. 22-39, 1993.

JORGE, P, PÉREZ, M., PÉREZ, G, PEREIRA, M., LOURENÇO, A. **A network perspective on antimicrobial peptide combination therapies: the potential of colistin, polymyxin B and nisin.** The International Journal of Antimicrobial Agents, v. 49, n. 6, p. 668-676, 2017. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2017.0.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E., JÁNOSI, S., SOMOGYI, P., DÁN, A., VAN DER GRAF-VAN BLOOIS, L., *et al.* **MRSA transmission between cows and humans.** *Emerging infectious diseases*, v. 13, n. 14, p. 630-632, 2017. DOI 10.3201/eid1304.060833.

KARPINSKI, T. M., SZKARADKIEWICZ, A. K. **Characteristic of bacteriocines and their application.** *Polish Journal of Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 223-235, 2013.

KAWADA-MATSUO, M., YOSHIDA, Y., ZENDO, T., NAGAO, J., OOGAI, Y., *et al.* **Three Distinct Two-Component Systems Are Involved in Resistance to the Class I Bacteriocins, Nukacin ISK-1 and Nisin A, in Staphylococcus aureus.** *Plos One*, v. 8, n. 7, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0069455.

KAUR, G., SINGH, T., MALIK, R., BHARDWAJ, A., DE, S. **Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against L. monocytogenes, E. faecium and E. faecalis and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants.** *The Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 2, p. 233-44, 2014. DOI 10.1007/s13197-011-0500-3.

KESKA, P., STADNIK, J., ZIELINSKA, D., KOLOZYN-KRAJEWSKA, D. **Potencial of bacteriocins from lab to improve microbial quality of dry-cured and fermented meat products.** *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 16, n. 2, p. 119-126, 2017. DOI 10.17306/J.AFS.2017.0466.

KINOSHITA, TOKUMASU, H., TANAKA, S., KRAMER, A., KAWAKAMI, K. **Policy implementation for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in seven European countries: a comparative analysis from 1999 to 2015.** *Journal of Market Access & Health Policy*, v. 5, n. 1, 2017. DOI 10.1080/20016689.2017.1351293.

KINROSS, P., PETERSEN, A., SKOV, R., VAN HAUWERMEIREN, E., PANTOSTI, A., *et al.* **Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among human MRSA isolates, European Union/European Economic Area countries, 2013.** *European communicable disease bulletin*, v. 22, n. 44, 2017. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.16-00696.

KRAUSHAAR, B., HAMMERL, J., KIENÖL, M., HEINIG, M., SPERLING, N., *et al.* **Acquisition of virulence factors in livestock-associated MRSA: Lysogenic conversion of CC398 strains by virulence gene-containing phages.** *Scientific Reports*, v. 7 n. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-02175-4.

KRIEGESKORTE, A., IDELEVICH, E., SCHLATTMANN, A., LAYER, F., STROMMINGER, B., *et al.* **Comparison of Different Phenotypic Approaches To Screen and Detect *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Journal of clinical microbiology*, v. 56, n. 1, 2018. DOI 10.1128/JCM.00826-17.

KOSHA, S., LAGEDROSTE, M., SMITS, S., H., J. **Protein defense systems against the lantibiotic nisin: function of the immunity protein NisI and the resistance protein NSR.** *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.00504.

KOSHA, S., ALKHATIB, Z., SMITS, S. **NSR from *Streptococcus agalactiae* confers resistance against nisin and encoded by a conserved *nsr* operon,** *Biological Chemistry*. v. 394, n. 11, p. 1543-1549, 2013. DOI 10.1515/hsz-2013-0167.

LAGHA, A., HAAS, B., GOTTSCHALK, M., GRENIER, D. **Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production.** *Veterinary Research*, v. 48, n. 1, p. 22, 2017. DOI 10.1186/s13567-017-0425-6.

LAGOS, R., TELLO, M., MERCADO, G., GARCIA, V., MONASTERIO, O. **Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin.** *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 74-85, 2009.

LAURENT, F., CHARDON, H., HAENNI, M., BES, M., REVERDY, M. E., MADEC, J., *et al.* **MRSA harboring mecA variant gene mecC, France.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 9, p. 1465-1467, 2012. DOI 10.3201/eid1809.111920.

LIMA, M. F. P., BORGES, M. A., PARENTE, R. S., JÚNIOR, R. C. V., OLIVEIRA, M.E. **Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares – revisão da literatura.** *Revista Uningá Review*, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LIN, J., PENG, Y., OU, Q., LIN, D., LI, Y., *et al.* **A molecular epidemiological study of methicillin-resistant, n. Staphylococcus environmental contamination in railway stations and coach stations in, p. Guangzhou of China.** *Letters Applied Microbiology*, v. 64, p. 131-137, 2016. DOI 10.1111/lam.12700.

LU, X., YI, L., DANG, J., DANG, Y., LIU, B., *et al.* **Purification of novel bacteriocin produced by Lactobacillus coryniformis MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms.** *Food Control*, v. 46, p. 264-271, 2014. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.05.028.

LUBELSKI, J., JONG, A., MERKERK, R., AGUSTIANDARI, H., KUIPERS, P., *et al.* **mrCD is a major multidrug resistance transporter in Lactococcus lactis.** *Molecular Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 771-781, 2006.

MAGIORAKOS, A., SRINIVASAN, A., CAREY, R., CARMELI, Y., FALAGAS, M., GISKE, C., *et al.* **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAIA, N., RIGOTTI, R., SILVA, R., LANGE, B., MECA, G., MACEDO, R., *et al.* **Nisin activity against contaminant bacteria isolated from bioethanol fermentation tanks.** *Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene Blucher Food Science Proceedings*, v.1, n.1, p. 137-138, 2014.

MANTOVANI, H., RUSSELL, J. **Nisin resistance of Streptococcus bovis.** *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 2, p. 808-813, 2001. DOI 10.1128/AEM.67.2.808-813.2001.

MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A. **Antimicrobial susceptibility of nisin resistant Listeria monocytogenes of dairy origin.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 252, p. 67-72, 2005.

MASIAS, E., DUPUY, F., SANCHES, P., FARIZANO, J., CILLI, E., *et al.* **Impairment of the class IIa bacteriocin receptor function and membrane structural changes are associated to enterocin CRL35 high resistance in Listeria monocytogenes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1861, n. 7, p. 1770-1776, 2017. DOI 10.1016/j.bbagen.2017.03.014.

MEIJERINK, M., HEMERT, S., TAVERNE, N., WELS, M., VOS, P., *et al.* **Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization.** Plos One, v. 5, n. 5, 2010.

MESA-PEREIRA, B., O'CONNOR, P., REA, M., COTTER, P., HILL, C., *et al.* **Controlled functional expression of the bacteriocins pediocin PA-1 and bactoformicin A in *Escherichia coli*.** Scientific reports, v. 7, n. 1, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-02868-w.

MEZAROBA, M., LONGHI, D., VEDOVATTO, E., ARAGÃO, G. **Estimativa da vida útil e dos parâmetros de crescimento de bactérias ácido lácticas em filés de peito de frango resfriados a vácuo e com atmosfera modificada.** Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2016.

MOKOENA, M., PAUL, M. **Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review.** Molecules, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017. DOI 10.3390/molecules22081255.

MOOSAVIAN, M., SHAHIN, M., NAVIDIFAR, T., TORABIPOUR, M. **Typing of staphylococcal cassette chromosome mec encoding methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in Ahvaz, Iran.** New Microbes and New Infections, v. 21, p. 90-94, 2018. DOI 10.1016/j.nmni.2017.11.006.

MURPHY, F., COTTER, D., HOGAN, A., SULLIVAN, O., JOYCE, A., *et al.* **Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity.** Gut Microbiota, v. 62, n. 2, p. 220-226, 2013.

MURRAY, P., ROSENTHAL, K., PFALLER, M. **Microbiologia médica.** Elsevier, 7a ed, 2014.

NG, W., FAHEEM, A., MCGEER, A., SIMOR, A., GELOSIA, A., *et al.* **Community and healthcare associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: an investigation into household transmission, risk factors, and environmental contamination.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v. 38, n. 1, p. 61-67, 2017. DOI 10.1017/ice.2016.245.

NIGAM, A., GUPTA, D., SHARMA, A. **Treatment of infectious disease: beyond antibiotics.** Microbiology Research, v. 169, n. 9, p. 643-651, 2014. DOI 10.1016/j.micres.2014.02.009.

OGAKI, M. B., FURLANETO, M.C., MAIA, L. F. **Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas.** Brazilian Journal Food Technology, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015. DOI 10.1590/1981-6723.2215.

OKUDA, K., ZENDO, T., SUGIMOTO, S., IWASE, T., TAJIMA, A., *et al.* **Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57, p. 5572-5579, 2013.

OLIVEIRA, D., C., LENCASTRE, H. **Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobiology Agents Chemotherapy, v. 46, n. 7, p. 2155-2161, 2002.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação**

da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OVCHINNIKOV, K., KRISTIANSEN, P., STRAUME, D., JENSEN, M., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., et. al. **The leaderless bacteriocin enterocin K1 is highly potent against *Enterococcus faecium*: a study on structure, target spectrum and receptor.** *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 774, 2017. DOI 10.3389/fmicb.2017.00774.

PAIK, W., PAYNICH, M., ALONZO, F., KNIGHT, K. **Protection from *Staphylococcus aureus* sepsis by bacterial exopolysaccharide.** *The Journal of Immunology*, v. 198, n.1, 2017.

PAPADOPOULOS, P., PAPADOPOULOS, T., ANGELIDIS, A., BOUKOUVALA, E., ZDRAGAS, A., et al. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece.** *Food Microbiology*, v. 69, p. 43-50, 2018. DOI 10.1016/J.FM.2017.07.016.

PARLET, C., KAVANAUGH, J., CROSBY, H., CECH, N., OBERLIES, N., et al. **Apicidin mediated attenuation of MRSA virulence corresponds with quorum sensing inhibition and enhanced immune effector responses.** *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 1, 2016.

PINHEIRO, M., CARDOSO, C., ALVES, M., ALVES, S. **Características clínicas e Esquema de Tratamento Medicamentoso de Infecções por *Staphylococcus aureus*: uma possível proposta de identificação para o laboratorista e tratamento para o clínico.** *Revista Práxis*, v. 3, n. 5, 2017.

PETERS, C., DULON, M., KLEINMULLER, O., NIENHAUS, A., SCHABLON, A., et al. **MRSA prevalence and risk factors among health personnel and residents in nursing homes in Hamburg, Germany – A cross-sectional study.** *Plos One*. v. 12, n.1, 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0169425.

PETERSDORF, S., HERMA, M., ROSENBLATT, M., LAYER, F., HEMRICH, B. **A novel SCC mec type XI primer to detect mec C-MRSA directly from screening specimens.** *J Clinical Microbiology*, v. 53, n. 12, p. 3938-3941, 2015. DOI 10.1128/JCM.02328-15.

PITTET, D., HUGONNET, S., HARBATH, S., et. al. **Effectiveness of a hospital-wide program to improve compliance with hand hygiene.** *Lancet*, v. 356, p. 1307-1312, 2000.

PRICE, J., COLE, K., BEXLEY, A., KOSTIOU, V., EYRE, D., et. al. **Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, p. 207-214, 2017. DOI 10.1016/S1473-3099(16)30413-3.

RAJEH, M., SABRA, A., KISSOYAN, K., FADLALLAH, S. **Molecular characterization of staphylococcal cassette chromosome mec an virulence encoding genes in methicillin-resistant staphylococci at a medical center in Lebanon.** *The International Journal of Antimicrobial Agents*, v.5, n. 1, p. 1-12, 2015. DOI 10.3823/765.

RAPHAEL, Z., SAM, L., ANNE, W., PETER, G., SAMUEL, K. **Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from humans in Nairobi, Kenya.** *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 18, p. 705-711, 2017. DOI 10.5897/AJMR2017.8481.

REX, J. H., OUTTERSON, K. **Antibiotic reimbursement in a model delinked from sales: a benchmark-based worldwide approach.** The Lancet Infectious Diseases, v. 16, m. 4, p. 500-505, 2016. DOI 10.1016/S1473-3099(15)00500-9.

RIBEIRO, J., *et al.* **Prevalence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 9, p. 52-55, 2005.

RIBOULET, E., STURME, H., JEFFERY, B., O'DONNELL, M., NEVILLE, A., *et al.* **Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocinAbp118 on the mouse and pig intestinal microbiota.** Plos One, v. 7, n. 2, p. 311-313, 2012.

ROLAIN, J., ABAT, C., JIMENO, M., FOURNIER, P., RAOULT, D. **Do we need new antibiotics?.** Clinical Microbiology and Infectious, v. 22, n. 5, p. 408-415, 2016. DOI 10.1016/j.cmi.2016.03.012.

SAHA, S., DAS, A., DEBNATH, A., BEGAM, S., SEN, S., *et al.* **Increased ROS generation: implication in antibacterial activity of *Evolvulus nummularius* against multidrug resistant gram negative bacterial strains.** Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 6, n. 1, p. 100-107, 2017. DOI 10.20546/ijcmas.2017.601.013.

SAMPEDRO, G., WARDENBURG, J. **This article has been temporarily withdrawn and will be reposted within a supplement in 2017. The Press apologizes for any inconvenience caused.** Journal of Infectious Diseases, v. 215, n. 1, 2017. DOI 10.1093/infdis/jiw581.

SAN SIT, P., SHUAN, C., TEH, J., IDRIS, N., SAM, I., *et al.* **Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia.** BMC Infectious Diseases, v. 17, n. 274, 2017. DOI 10.1186/s12879-017-2384-y.

SANDIFORD, S. **Perspectives on lantibiotic discovery – where have we failed and what improvements are required?** Expert Opinion on Drug Discovery, v. 10, n. 4, p. 315-230, 2015. DOI 10.1517/17460441.2015.1016496.

SCHERER, K., WIEDEMANN, I., CIOBANASU, C., SAHL, H., KUBITSCHKE, U. **Aggregates of nisin with various bacto-prenol-containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA), v. 1828, n. 11, p. 2628-2636, 2013. DOI 10.1016/j.bbame.2013.07.014.

SHASHINDRAN, N., NAGASUNDARAM, N., THAPPA, D. M., SISTLA, S. **Can panton valentine leukocidin gene and clindamycin susceptibility serve as predictors of community origin of MRSA from skin and soft tissue infections?.** Journal of Clinic Diagnosis Resarch, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2016. DOI 10.7860/JCDR/2016/14531.7036.

SIEGEL, E., JACKSON, M., CHIARELLO, L., *et al.* **Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006.** Cent Dis Cont. 2008.

SNYDER, A. B., WOROBO, R. W. **Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, n. 1, p. 28-44, 2014. DOI 10.1002/jsfa.6293.

SOUZA, E., *et al.* **Combined application of *Origanum vulgari* I. Essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods.** Brazilian Journal Microbiology, v. 40, n. 1, p. 387-393, 2009.

SRIMARK, N., KHUNAJAKR, N. **Characterization of the bacteriocin-like substance from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* WX153 against swine pathogen *Streptococcus suis*.** Journal of Health Research, v. 29, n. 4, 2015. DOI 10.14456/jhr.2015.16.

STEFANI, S., CHUNG, D., LINDSAY, J., FRIEDRICH, A., KEARNS A., WESTH, H., *et al.* **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods.** Internacional Journal of Antimicrobial Agents., v. 39, n. 4, p. 273-282, 2012. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030.

STRYJEWSKI, M. R., COREY, G. R. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen.** Clinical Infec Diseases, v. 58, n. 1, p. 10-19, 2014. DOI 10.1093/cid/cit613.

SUFFREDINI, I. B., VARELLA A. D., YOUNES, R. N. **Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da floresta Amazônica e da mata Atlântica brasileiras.** Revista do Instituto de Ciências da Saúde, v. 25, n. 2, p. 127-129, 2007.

TANG, Y., CAO, R., XIAO, N., LI, Z., WANG, R., *et al.* **Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Xiangyang, China.** Journal of Global Antimicrobial Resistance, v. 12, p. 31-36, 2018. DOI 10.1016/J.JGAR.2017.08.016.

THEDIECK, K., HAIN, T., MOHAMED, W., TINDALL, J., NIMITZ, M., *et al.* **The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*.** Molecular Microbiology, v. 62, n. 2, p. 1325-1339, 2006.

TOGNERI, A. M., PODESTÁ, L. B., PÉREZ, M. P., SANTISO, G. M. **Study of *Staphylococcus aureus* infections in a general acute care hospital (2002-2013).** Revista Argentina de Microbiologia, v. 49, n. 1, p. 24-31, 2017. DOI 10.1016/j.ram.2016.09.006.

TOLDI, M., KAPPLER, T., SALVATORI, R., UHRIG, R. **Crescimento de cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em meios de cultura industriais.** Destaques acadêmicos, v. 6, n. 3, 2014.

TONG, Z., ZHANG, Y., LING, J., MA, J., HUANG, L., *et al.* **An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*.** Plos One, v. 9, n. 2, 2014.

TORTORA, J., FUNKE, R., CASE, L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

URDANGARIN, L., MIELKE, T., HORNER, R., DE, M., RODRIGUES, A., *et al.* **Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário.** Saúde (Santa Maria), v.37, n.1, p. 23-30, 2011.

VAN HEEL, A.J., MONTALBAN-LOPEZ, M., KUIPERS, O.P. **Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans.** Expert Opin Drug Metab Toxicol, v. 6, p. 675-680, 2011.

VELAMAKANNI, S., YAO, Y., GUTMANN, A., VAN VENN, W. **Multidrug transport by the ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus***. *Biochemistry*, v. 47, n. 35, p. 9300-9308, 2008.

VUONG, C., YEH, A., CHEUNG, G., OTTO, M. **Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Journal Expert Opinion on Investigational Drugs*, v.25, n. 1, p. 73-93, 2016. DOI 10.1517/13543784.2016.1109077.

WALLIN, R., HERN, G., FRAZEE, W. **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Emergency Medicine Clinics North America*, v.26, n. 2, p. 431-455, 2008.

ZHANG, K., SPARLING, J., CHOW, B., ELSAYED S., HUSSAIN, Z., et. al. **New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 4947-4955, 2004. DOI 10.1128/JCM.42.11.4947-4955.2004.