



ATIVIDADE INIBITÓRIA DE MUTACINAS SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus* spp., MULTIRRESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS.

Alane Torres de Araújo Lima¹ & Regianne Umeko Kamiya²

¹ Graduanda de medicina, FACIG, alane_torres@hotmail.com

² Cirurgiã dentista, Profa. Dra. em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de Alagoas, ruk@icbs.ufal.br

Resumo- Este estudo analisou a produção de mutacinas de *Streptococcus mutans* contra bactérias multirresistentes de interesse médico, associadas às infecções hospitalares de difícil terapêutica. A metodologia utilizada foi a bacteriocinotipagem pelo do método do antagonismo. Foram utilizadas 13 cepas de *Streptococcus mutans* produtoras de mutacinas. Apenas uma cepa não apresentou produção de mutacinas, entretanto 7 apresentaram amplo espectro antimicrobiano, inibindo as três espécies analisadas. Um total de 16 cepas (8 *Acinetobacter*, 6 *P. aeruginosa* e 2 *S. aureus*) não foram inibidas por nenhuma das produtoras, entretanto, mutacinas de interesse foram encontradas no trabalho, sobretudo com atividade inibitória sobre bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e/ou fluorquinolonas, assim como contra estafilococos com perfil MRSA e/ou VISA. Com os resultados obtidos, fica clara a capacidade de cepas de *Streptococcus mutans* de produzir substâncias semelhantes às mutacinas de amplo espectro, contra bactérias nosocomiais e multirresistentes aos antibióticos usuais.

Palavras-chave: Mutacinas; Multirresistência aos antibióticos; *S. mutans*.

Área do conhecimento: Microbiologia

INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans é uma bactéria ácido-lática e o principal agente etiológico da cárie dental humana. A produção de mutacinas ou bacteriocinas por *S. mutans* é um dos principais fatores de virulência (MERRITT & QI, 2012). As mutacinas são peptídeos antimicrobianos capazes de inibir espécies ecologicamente relacionadas. Estas substâncias podem favorecer a colonização de *S. mutans* produtores, no biofilme dental, por inibição de muitas espécies sensíveis da cavidade bucal, contribuindo para a estabilidade de *S. mutans* e consequentemente, para o desenvolvimento da cárie dental (KURAMITSU, *et al.*, 2007; KAMIYA *et al.*, 2005; 2011).

Estudos prévios detectaram cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas de amplo espectro contra diferentes espécies bacterianas da cavidade bucal, enfatizando o potencial ecológico destas moléculas (KAMIYA *et al.*, 2005), assim o presente trabalho testará o potencial antimicrobiano destas mutacinas frente bactérias de interesse médico. O trabalho utilizou como

cepas indicadoras três principais espécies bacterianas isoladas de infecções nosocomiais: *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. e com diferentes perfis de resistência aos antibióticos.

Especialmente em pacientes imunodeprimidos, que realizam terapia antibacteriana ou antineoplásica, por um longo período (MUSSI *et al.* 2010, SYDNOR & PERL, 2011). A emergência e a disseminação de cepas multirresistentes, incluindo cepas resistentes a todos os tipos de antibióticos usuais, é um problema crescente, e está associado com os altos índices de morbidade e mortalidade (BLOSSOM & SRINIVASAN, 2008; DIJKSHOORN *et al.* 2007).

Diante da crescente emergência de micro-organismos multirresistentes aos antibióticos usuais e do declínio da produção e descoberta de novos fármacos, torna-se importante o estudo de novas possibilidades terapêuticas para infecções causadas por bactérias multirresistentes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de mutacinas de *Streptococcus mutans* contra bactérias multirresistentes de interesse

médico, associadas às infecções hospitalares de difícil terapêutica, representadas por cepas de *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. multirresistentes aos antibióticos.

METODOLOGIA

Foram selecionados 15 isolados clínicos de *A. baumannii* e 15 *P. aeruginosa* multirresistentes aos beta-lactâmicos (como penicilinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e cefalosporinas), às fluorquinolonas e/ou aos aminoglicosídeos. Também foram selecionados 20 isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à metilina (MRSA e MRS) e/ou com resistência intermediária à vancomicina (VISA). Um total de 50 cepas, isoladas de infecções nosocomiais, foram utilizadas como indicadoras do espectro de ação de mutacinas de 13 cepas de *Streptococcus mutans*. As cepas de *S. mutans* foram classificadas como produtoras de mutacina de amplo espectro, e foram identificadas em estudos prévios (KAMIYA *et al.*, 2008). A produção de bacteriocinas foi testada pelo método do antagonismo, descrito por KAMIYA *et al.* (2005 e 2008). Resumidamente, as 13 cepas produtoras de mutacinas foram inoculadas por picadas equidistantes, com uso de um repicador sobre a superfície da placa de Petri, contendo meio Tryptic Soy Agar (TSA) a 1,5%. Após incubação por 48h, a 37°C em microaerofilia, as placas foram cobertas com meio TSA 0,8% (5 mL) contendo 0,5mL de uma cultura *overnight* de uma cepa indicadora (108 UFCmL⁻¹). Após 24h de incubação, nas mesmas condições e aerofilia, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado em mm. Todos os testes foram realizados em duplicata e a inibição da cepa indicadora foi considerada positiva, quando o diâmetro do halo inibitório apresentou-se maior ou igual a 6 mm (WU *et al.*, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cepa CP2 não produziu mutacina com atividade inibitória contra nenhuma das 50 cepas indicadoras utilizadas. Já a CP1 foi a cepa produtora de bacteriocina(s) de maior espectro antimicrobiano, inibindo o crescimento de 27 cepas (17 *Staphylococcus*, 8 *P. aeruginosa* e 1 *A. baumannii-calcoaceticus*) dentre as 50 cepas indicadoras, o que representa 52% do total (tabela 1).

Isolados de *Staphylococcus*, incluindo os de perfil MRS/MRSA e/ou VISA, foram os mais sensíveis à ação antimicrobiana das mutacinas. *P. aeruginosa* e *A. baumannii-calcoaceticus*, foram mais resistentes às mutacinas em relação aos *Staphylococcus* spp., ou seja, os micro-organismos Gram negativos apresentaram um perfil de maior resistência à ação inibitória das mutacinas. Uma possível explicação pode ser atribuída à presença da membrana celular externa em bactérias Gram negativas, característica que pode lhes conferir resistência intrínseca a muitas classes de antimicrobianos, devido a baixa permeabilidade celular aos mesmos. Entretanto, alguns isolados Gram negativos foram inibidos, sugerindo assim, que mais estudos sobre os mecanismos de ação de substâncias semelhantes às mutacinas, bem como sobre os respectivos mecanismos de resistência devem ser analisados, de modo a comprovar sua efetividade e possível aplicação biotecnológica.

Um total de 12 *S. mutans* (92,3%) produziram mutacinas ativas contra *Staphylococcus* spp., 11 (84,62%) contra *Pseudomonas* e 7 (53,85%) contra *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. Dentre as 12 cepas produtoras, 7 (53,85%) apresentaram amplo espectro inibitório, produzindo mutacinas contra as três espécies analisadas e 5 (38,46%) inibiram o crescimento de 2 das espécies indicadoras.

Tabela 1 - Número de cepas indicadoras, por espécie de interesse clínico e respectivas porcentagens de inibição. deixe esta tabela na outra coluna

Cepas Produtoras	Nº de cepas indicadoras por espécie de interesse clínico			% de cepas indicadoras inibidas
	<i>Acinetobacter</i>	<i>P. aeruginosa</i> (n=15)	<i>S. aureus</i> (n=20)	
CP2	-	-	-	0%
CP13	1	-	1	4%
CP11	-	1	1	4%
CP8	-	1	2	6%
CP10	1	1	2	8%
CP12	1	1	3	10%
CP9	-	2	3	10%
CP7	-	2	5	14%
CP6	1	2	5	16%
CP5	1	3	4	16%
CP4	-	3	6	18%
CP3	1	3	7	22%
CP1	1	8	17	52%

Os achados na literatura quanto à atividade inibitória de mutacinas contra bactérias multirresistentes são escassos, porém, CAMARGO (2009), ao analisar o espectro antimicrobiano de mutacinas sobre micro-organismos de interesse médico e odontológico, pelo método do antagonismo descrito por KAMIYA *et al.* (2005) encontrou, além de atividade antimicrobiana contra espécies colonizadoras primárias da cavidade bucal e contra espécies correlacionadas ecologicamente com *S. mutans*, atividade inibitória sobre o crescimento de espécies de interesse médico representadas por *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, e assim como no presente estudo, *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas também multirresistentes aos antibióticos usuais.

NICOLAS *et al.* (2010), ao compararem a atividade antimicrobiana de dois tipos de mutacinas, descreveram que uma delas foi capaz de inibir *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*, ambos multirresistentes à diversas classes de antibióticos. Tais dados, aliados aos apresentados neste trabalho, ratificam a necessidade de que pesquisas similares sejam intensificadas, sobretudo frente a atividade das mutacinas contra *Staphylococcus aureus*, uma vez cepas multirresistentes tem apresentado, em

diferentes trabalhos, considerável sensibilidade frente às mutacinas.

CONCLUSÃO

Assim, fica clara a capacidade de *Streptococcus mutans* produzir mutacinas de amplo espectro contra bactérias nosocomiais multirresistentes aos antibióticos usuais, principalmente contra *Staphylococcus* spp. multirresistentes, considerados, atualmente, os principais micro-organismos relacionados com infecções comunitárias e hospitalares de difícil terapêutica. A escassez de dados na literatura que corroboram os achados deste estudo, em adição à crescente dificuldade de se controlar e tratar infecções hospitalares, evidencia a necessidade de mais estudos sobre as mutacinas de *Streptococcus mutans*, com futura aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

BLOSSOM, DB; SRINIVASAN, A. Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex: An Emerging Nosocomial Pathogen With Few Treatment Options. Infectious Diseases in Clinical Practice _ Volume 16, Number 1, January 2008. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/46/8/1254.full>. Acesso em 01 Set. 2015.

CAMARGO, R.A.P. Espectro de atividade antimicrobiana de mutacinas produzidas por *Streptococcus mutans* sobre microrganismos de interesse médico e odontológico. 2009. 26f. Tese de conclusão de curso- Faculdade de odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. 2009

DIJKSHOORN, L; NEME, A; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. V. 5, n.12, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007677>. Acesso em: 07 set. 2015.

KAMIYA RU, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. J Med Microbiol. 2008 May; 57(Pt 5):626-35.

KAMIYA RU, NAPIMOGA MH, ROSA RT, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Mutacins

production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol. Immunol. 20: 20-24, 2005.

KAMIYA, R.U; TAIETE, T; GONÇALVES, R.B. Mutacins of *Streptococcus mutans*. Brazilian Journal of Microbiology. V.42. p.1248-1258. 2011.

KURAMITSU, H.K; HE, X; LUX, R; ANDERSON, M.H; SHI, W. Interspecies interactions within oral microbial communities. Microbiol Mol Biol Rev. V.71, n.4, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063722>. Acesso em: 07 set.2015.

LAPOINTE, G; LAVOIE, MC. Comparative antimicrobial activity of two new mutacins. West Indian med. j., Mona, v. 59, n. 6, Dec. 2010. Disponível em: http://caribbean.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0043-

31442010000600004&lng=en&nrm=iso. Acesso em 01 Set. 2015.

MERRITT, J; QI, F. The Mutacins of *Streptococcus mutans*: Regulation and Ecology. Mol Oral Microbiol. V. 27, n.2, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296966/?tool=pubmed>. Acesso em: 07 set.2015.

MUSSI, M.A; GADDY, J.A; CABRUJA, M; ARIVETTI, B.A; VIALE, .AM; RAISA, R. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. J Bacteriol. V192, n. 24, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3008525>. Acesso em: 07 set.2015. NICOLAS, GG;

SYDNOR, E.R; PERL, T.M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. Clin Microbiol Rev. V. 24, n. 1, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3021207/>. Acesso em: 07 set.2015.