

Análises *in silico* das endolisinas de bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* associados a produtos lácticos e mastite bovina

¹Juliana de Almeida Leite

¹Edna Froeder Arcuri

²Alessandra Isis Alves Pinheiro Ramos

²Selda Loase Salustiano Marques

³Letícia Caldas Mendonça

¹ Pesquisadora – Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora, MG. CEP: 36038-330. Tel: 55 32 3249-4885. juliana@cnpagl.embrapa.br

² Estagiária – Embrapa Gado de Leite

³ Analista – Embrapa Gado de Leite

Resumo

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um patógeno bacteriano capaz de produzir enterotoxinas responsáveis por intoxicação alimentar estafilocócica, sendo reconhecido como freqüente agente causador de infecções intramamárias em vacas leiteiras e sendo comumente isolado em produtos lácticos de gado leiteiro com mastite. A antibioticoterapia é componente importante do programa de controle de *S. aureus*. O uso contínuo e indiscriminado de antibióticos tem resultado na seleção de linhagens bacterianas resistentes e em aumento da preocupação da disseminação, via alimentos, de genes de resistência e de doenças de difícil controle pelos métodos terapêuticos convencionais. Alternativas ao uso dos antibióticos no controle de *S. aureus* associados a produtos lácticos e mastite bovina têm sido estudadas, entre estas, o uso das endolisinas de bacteriófagos. As endolisinas degradam especificamente o peptídeoglicano da célula hospedeira e as ligações alvo que são hidrolisadas estão presentes apenas na parede celular bacteriana (Loessner, 2005; Donovan et al., 2006). O objetivo desse trabalho foi analisar as endolisinas de bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* associados a produtos lácticos e mastite bovina previamente isolados. A análise da sequência de nucleotídeos e aminoácidos inferidos para a endolisina dos bacteriófagos isolados permitiu verificar a existência dos três domínios envolvidos no reconhecimento e lise da parede celular bacteriana.

Palavras-chaves: endolisina, bacteriófagos, *Staphylococcus aureus*, mastite, produtos lácticos

Introdução

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um patógeno bacteriano capaz de produzir enterotoxinas responsáveis por intoxicação alimentar estafilocócica, sendo reconhecido como freqüente agente causador de infecções intramamárias em vacas leiteiras e sendo comumente isolado em produtos lácticos produzidos com leite de vacas com mastite (Donovan et al., 2006; Obeso, et al., 2008). A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo, e aquela que causa as maiores perdas econômicas à cadeia produtiva do leite. Em todo o mundo é estimada uma perda de 35 bilhões de dólares por ano devido à mastite (O'Flaherty et al., 2005). No Brasil, estima-se, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, perda de produção entre 12 e 15%, o que significa cerca de 3 bilhões de litros de leite/ano (Fonseca & Santos, 2000). Além das perdas relacionadas à redução e descarte do leite produzido, gastos com medicamentos e serviços veterinários, e redução do valor comercial dos animais infectados, a ocorrência de mastite afeta também a indústria de laticínios, devido às alterações na composição do leite.

A antibioticoterapia é componente importante do programa de controle de *S. aureus*. Porém, *S. aureus* é considerado de difícil eliminação dos rebanhos, sendo moderadamente susceptível a antibióticos quando a infecção é detectada em seu início e de difícil cura nas infecções crônicas (Owens et al., 1997; Brito et al., 2002). O uso de antibióticos no tratamento de animais é uma preocupação para a saúde pública e um dos maiores desafios para a indústria de alimentos, pois resíduos de antibióticos podem ser eliminados no leite e na carne por períodos variáveis, de acordo com a preparação e a via de aplicação do medicamento. Presença de resíduos de antibióticos no leite interfere na fabricação de produtos lácteos fermentados como queijos e iogurte. Os riscos à saúde do consumidor são representados por reações alérgicas, freqüentemente associadas aos antibióticos β – lactâmicos, que são os mais administrados às vacas de leite, distúrbios da microbiota intestinal e discrasias sanguíneas. Além disso, o uso contínuo e indiscriminado de antibióticos tem resultado na seleção de linhagens bacterianas resistentes e em aumento da preocupação da disseminação, via alimentos, de genes de resistência e de doenças de difícil controle pelos métodos terapêuticos convencionais (Tollefson & Flynn, 2002). Em consequência, alternativas ao uso dos antibióticos no controle de *S. aureus* associados a produtos lácticos e mastite bovina têm sido estudadas, entre estas, o uso das endolisinas de bacteriófagos.

As endolisinas de bacteriófagos são de interesse como antimicrobiano contra bactérias Gram-

positivas devido à alta especificidade de hospedeiro (Donovan et al., 2006). Por causa dessa ação específica das endolisinas, elas oferecem uma possibilidade única de controle biológico de bactérias indesejadas sem afetar outros organismos, como a microbiota natural (Loessner, 2005). As endolisinas degradam especificamente o peptídeoglicano da célula hospedeira e as ligações alvo que são hidrolisadas estão presentes apenas na parede celular bacteriana (Loessner, 2005; Donovan et al., 2006). Análises da sequência de aminoácido de algumas endolisinas têm revelado que essa enzima é uma proteína modular composta de 3 domínios (Donovan et al., 2006; Obeso et al., 2008). O domínio CHAP é uma hidrolase envolvida na clivagem de peptídeoglicano, o domínio amidase cliva a ligação amida entre N-actilmuramyl-L-alanina na parede celular bacteriana e o domínio SH3b está envolvido no reconhecimento da parede celular (Wang et al., 1991, Mayer, 2001, Bateman & Rawlings, 2003). O uso de endolisinas recombinantes tem sido relatado para uma variedade de patógenos, sendo as endolisinas de bacteriófagos específicos para *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* caracterizadas para utilização no tratamento de mastite bovina e controle bacteriano em leite e derivados (Donovan et al., 2006; Obeso et al., 2008).

Metodologia

Seis bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* associados a produtos lácteos e mastite bovina (Fago 1, Fago 2, Fago 3, Fago 4, Fago 5 e Fago 6), anteriormente isolados em nosso laboratório, foram utilizados para estudo *in silico* da endolisina. A extração de ácidos nucleicos dos bacteriófagos foi realizada de acordo com Sambrook & Russell (2001). Após a propagação dos fagos e total lise bacteriana, foi acrescentado DNase e RNase para degradação de qualquer ácido nucleico bacteriano. A extração do DNA viral foi realizada por meio de solução saturada de fenol em tampão TE (10mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA), seguida da mistura clorofórmio – álcool isoamílico (24:1).

A região correspondente ao gene da endolisina foi amplificada por PCR segundo metodologia descrita por Donovan e colaboradores (2006). Os amplicons obtidos foram seqüenciados, utilizando-se o *DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing kit* (GE Healthcare). O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático de DNA MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare). Para cada amostra foram realizadas no mínimo 3 seqüenciamentos. As seqüências finais foram determinadas utilizando o programa cap3.

As análises e estudos filogenéticos destas seqüências nucleotídicas e de aminoácidos inferidos foram realizados utilizando-se os programas BLAST (Altschul et al., 1990) e MEGA4 (Tamura et al., 2007). As análises dos domínios protéicos das endolisinas foram realizadas por meio do programa Pfam 24.0 (Finn et al, 2008).

Resultados e Discussão

Uma vez que as endolisinas dos bacteriófagos estão relacionadas com a degradação da parede celular e lise bacteriana, as regiões correspondentes ao gene da endolisina dos bacteriófagos isolados foram amplificadas e seqüenciadas. Os tamanhos dos fragmentos seqüenciados foram de 1455 pares de bases (pb) para todos os seis bacteriófagos. As seqüências nucleotídicas do gene da endolisina dos Fagos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), recebendo os números de acessos GU722132, GU722134, GU722133, GU722135, GU722136, GU722131, respectivamente.

O gene da endolisina se apresentou bastante conservado com uma identidade de nucleotídeos maior de 99% entre os bacteriófagos isolados (Tabela 1). Os Fagos 2 e 4, que em experimentos anteriores demonstraram ter maior capacidade lítica e espectro de hospedeiro, apresentaram identidade de nucleotídeos para as sequencias correspondente ao gene da endolisina de 99,9%. Quando essas sequencias foram comparadas com as sequencias obtidas para os Fagos 1, 3, 5 e 6, o valor de identidade de nucleotídeos foi menor. Do mesmo modo, estes bacteriófagos que possuem uma menor capacidade lítica e espectro de hospedeiro, apresentaram uma maior identidade nucleotídica entre as sequencias correspondentes ao gene da endolisina.

Árvores filogenéticas utilizando as seqüências nucleotídicas dos bacteriófagos isolados foram construídas. As topologias apresentadas pelas árvores filogenéticas não enraizadas construídas utilizando os métodos de evolução mínima, máxima parcimônia, agrupamento de vizinhos e UPGMA foram muito similares (Figura 1). Em todas as árvores filogenéticas, houve um agrupamento dos bacteriófagos isolados em três grupos principais. Os Fagos 1, 5 e 6 foram agrupados no grupo 1. O grupo 2 compreendeu os Fagos 2 e 4, enquanto o Fago 3 constituiu o grupo 3. Esses agrupamentos refletem as identidades nucleotídicas obtidas para o gene da endolisina entre os bacteriófagos isolados, onde foram observadas maiores similaridade entre bacteriófagos agrupados dentro de um mesmo grupo.

Os Fagos 2 e 4, agrupados no grupo 2, apresentaram uma distância filogenética maior em relação aos bacteriófagos dos grupo 1 e 3. Essa distância pode ser correlacionada com os resultados obtidos para os testes de atividade lítica, onde os Fagos 2 e 4 apresentaram capacidade de lise bacteriana e espectro de hospedeiro superiores ao dos outros bacteriófagos isolados (Figura 1 e Tabela 1).

As seqüências de aminoácidos para o gene da endolisina dos bacteriófagos isolados foram inferidas com base nas seqüências nucleotídica. Essas seqüências de aminoácidos inferidas permitiram comparar os bacteriófagos isolados com base nas propriedades protéicas da endolisina, pois devido à degeneração dos

códons, nem sempre uma mudança na terceira base resulta em uma alteração o aminoácido codificado. As sequências obtidas foram utilizadas, juntamente com as sequências de aminoácidos inferidas a partir das sequências de nucleotídeos disponíveis para outros bacteriófagos disponíveis no GenBank, para a construção de árvore filogenética pelo método da evolução mínima (Figura 2). Os bacteriófagos isolados foram agrupados em um mesmo ramo, estando mais próximos do bacteriófago phiMR25. Adicionalmente, os bacteriófagos isolados foram agrupados em um ramo separado do bacteriófago phi11 que foi o primeiro bacteriófago que teve o gene da endolisina isolado e a endolisina caracterizada como uma enzima lítica, sendo o bacteriófago protótipo para o essa enzima (Donovan et al., 2006). Dentro do ramo em que os bacteriófagos isolados foram agrupados, os Fagos 1, 3, 5 e 6 foram agrupados em um mesmo subgrupo, reforçando a distância encontrada entre o gene da endolisina desses bacteriófagos e dos Fagos 2 e 4 nas reconstruções filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas. Essa topologia obtida, demonstra que as endolisinas dos Fagos 2 e 4 estão mais próximas à endolisina do bacteriófago protótipo phi11 que as endolisinas dos Fagos 1, 3, 5 e 6 em relação à endolisina do bacteriófago phi11.

As análises das sequências dos 481 aminoácidos inferidos a partir do gene da endolisina de cada bacteriófago isolado revelaram que a endolisina de todos os seis bacteriófagos é uma enzima modular. Na sequência da endolisina dos bacteriófagos isolados foram identificados três domínios distintos: CHAP (amidohidrolase cisteína histidina dependente), amidase 2 (N-actilmuramil-L-alanina amidase) e SH3b (reconhecimento da parede celular bacteriana) (Figura 3A). Assim sendo, as endolisinas expressadas pelos bacteriófagos isolados potencialmente possuem domínios para reconhecimento e lise da parede celular de *S. aureus*. Essa organização modular contendo esses três domínios já foi descrita para a endolisina de outros bacteriófagos líticos de *S. aureus* (O'Flaherty et al., 2005b, Donovan et al., 2006, Obeso et al., 2008).

Com relação à sequência de aminoácidos dos três domínios, os Fagos 1, 5 e 6 apresentaram sequências de aminoácidos idênticas (Figura 3B). Essas sequências foram muito similares à sequência do Fago 3, onde foi encontrada apenas uma substituição por um aminoácido não relacionado no domínio Amidase 2. Apesar de apresentarem uma menor homologia com relação às sequências dos Fagos 1, 3, 5 e 6, as sequências de aminoácidos dos três domínios da endolisina do Fago 2 e 4 apresentaram maior homologia com a sequência de aminoácidos do bacteriófago phi11. Apesar da atividade lítica de um bacteriófago ser dependente de vários outros fatores, a proximidade da endolisina dos Fagos 2 e 4 com a endolisina protótipo do bacteriófago phi11 pode estar relacionada com a maior atividade lítica apresentada por esses bacteriófagos.

Conclusões

A análise da sequência de nucleotídeos e aminoácidos inferidos para a endolisina dos bacteriófagos isolados permitiu verificar a existência dos três domínios, identificados como CHAP, amidase 2 e SH3b, que estão envolvidos no reconhecimento e lise da parede celular bacteriana. Deste modo, estudos envolvendo a expressão dessa proteína e o seu potencial como agente antimicrobiano no controle de *S. aureus* causadores de mastite bovina e contaminação de leite e derivados poderão ser realizados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E. W.; LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BATEMAN, A.; RAWLINGS, N. D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 234-237, 2003.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. **Como (re) conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 70.).

DONOVAN, D. M.; LARDEO, M.; FOSTER-FREY, J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, p. 133-139, 2006.

FINN, R. D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P. C.; SAMMUT, J. S.; HOTZ, H. R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S. R.; SONNHAMMER, E. L.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 281-288, 2008.

FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.

LOESSNER, M. J. Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 480-487, 2005.

MAYER, B. J. SH3 domains: complexity in moderation. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 1253-1263, 2001.

OBESO, J. M.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 212-218, 2008.

O'FLAHERTY, S.; COFFEY, A.; MEANEY, W.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7161-7164, 2005.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 313-317, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: CSH, 2001. 345 p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T. Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: status report. **AAPS Pharm Sci**, v. 4, p. 1-10, 2002.

WANG, X.; WILKINSON, B. J.; JAYASWAL, R. K. Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. **Gene**, v. 102, p. 105-109, 1991.

Tabela 1. Identidade entre as sequências de nucleotídeos do gene da endolisina dos bacteriófagos isolados e bacteriófagos disponíveis no GenBank.

Bacteriófagos	Identidade de Nucleotídeos					
	Fago 1	Fago 2	Fago 3	Fago 4	Fago 5	Fago 6
Fago 1	-					
Fago 2	99.5%	-				
Fago 3	99.7%	99.6%	-			
Fago 4	99.5%	99.9%	99.6%	-		
Fago 5	99.8%	99.6%	99.7%	99.6%	-	
Fago 6	100%	99.5%	99.8%	99.5%	99.9%	-

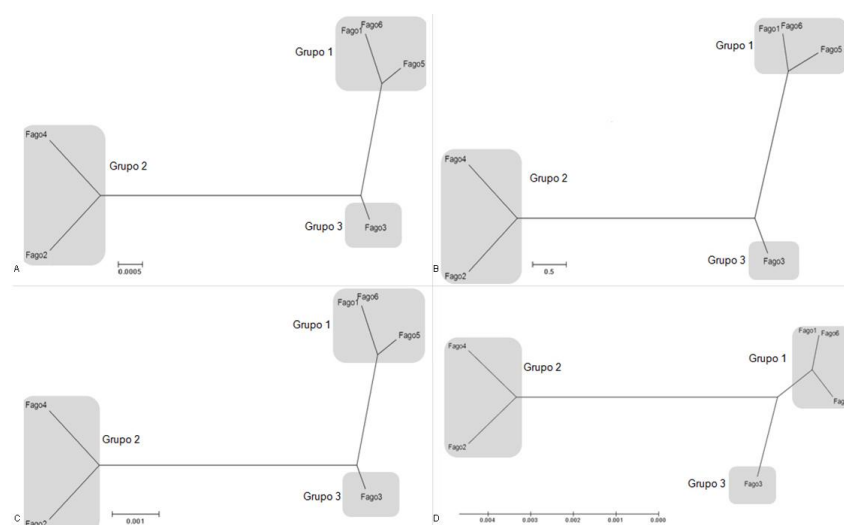


Figura 1. Árvores filogenéticas construídas pelos métodos de evolução mínima (A), máxima parcimônia (B), agrupamento de vizinhos (C) e UPGMA (D). Reconstruções filogenéticas foram baseadas nas sequências nucleotídica do gene da endolisina dos bacteriófagos isolados. As sequências foram agrupadas usando o programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), com “bootstrap” de 1000 replicatas e “cutoff” de 75%.

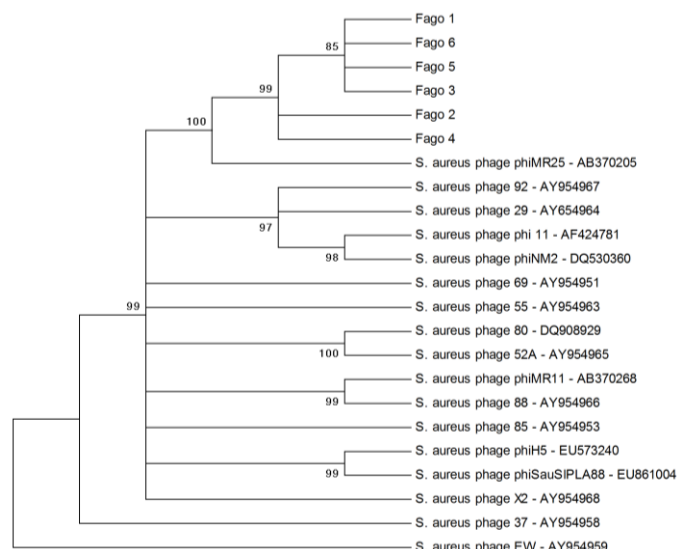


Figura 2. Reconstrução filogenética não enraizada baseada na sequência de aminoácidos da endolisina. As sequências foram agrupadas pelo método da evolução mínima usando o programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007), com “bootstrap” de 1000 replicatas e “cutoff” de 75%. Número de acesso no GenBank ao lado do nome do bacteriófago.

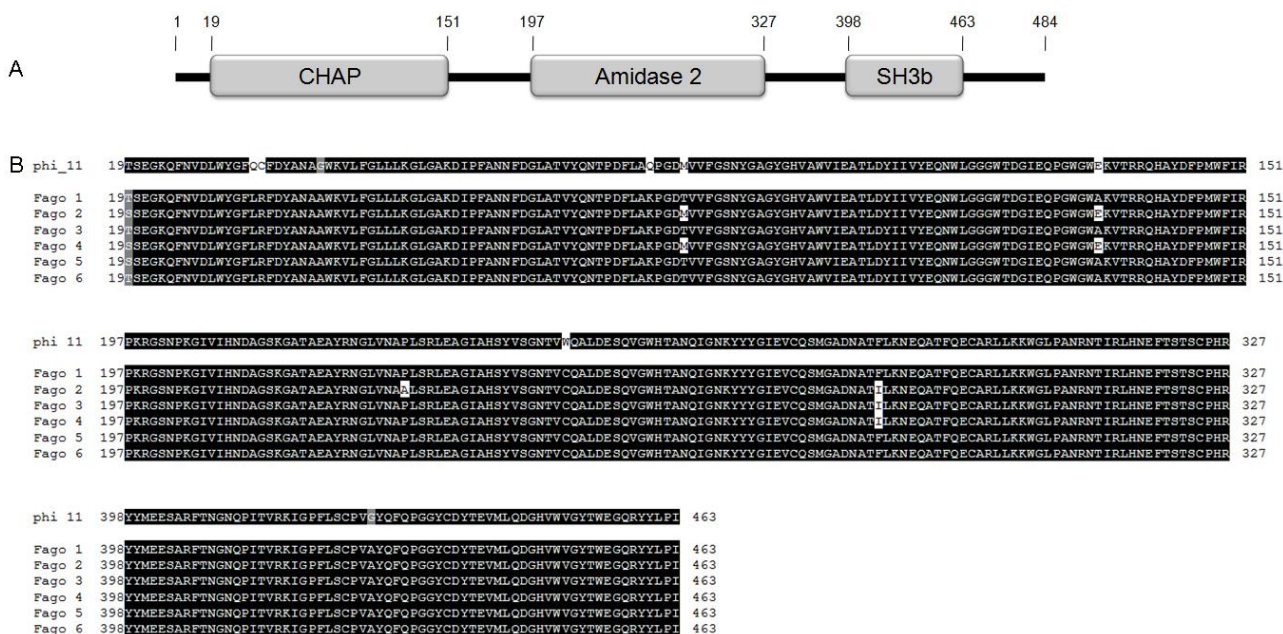


Figura 3: Análise das sequências de aminoácidos da endolisina dos bacteriófagos líticos isolados (Fago 1, Fago 2, Fago 3, Fago 4, Fago 5 e Fago 6) e bacteriófago phi 11. (A) Organização dos domínios obtida pelo programa Pfam version 24.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) contendo os domínios CHAP (amidohidrolase cisteína histidina dependente), Amidase 2 (N-actilmuramil-L-alanina amidase), SH3b (reconhecimento da parede celular bacteriana) Alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios CHAP (B), amidase 2 (C) e SH3b (D) dos bacteriófagos líticos isolados e bacteriófago phi 11. O alinhamento foi realizado pelo programa BOXSHADE [www server](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Fundo preto indica aminoácidos idênticos, fundo cinza indica substituições conservativas e fundo branco indica aminoácidos não relacionados.