

Resumo 35 - PESQUISA DE GENES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE CÁPSULA E BIOFILME EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE LEITE BOVINO¹.

IDENTIFICATION OF GENES RELATED TO CAPSULE AND BIOFILM PRODUCTION IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM BOVINE MILK.

Deividy Kellvy Barreto²; Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena³; Juliana Alves Dias⁴; Luciano Bastos Lopes⁵; Luiz Francisco Zafalon⁶; Tania Valeska Medeiros Dantas Simões⁷; Maria Edi Rocha Ribeiro⁸; Carla Christine Lange⁹

¹Apoio financeiro Embrapa (02.13.14.001.00.00) e CNPq (403098/2013-0). D. Barreto é bolsista PIBIC-CNPq. ²Graduando em Biomedicina, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG. Email: deividybarreto@gmail.com

³Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Email: alessandrasalimena@yahoo.com.br ⁴Pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO. Email: juliana.dias@embrapa.br ⁵Pesquisador da Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop, MT. Email: luciano.lopes@embrapa.br ⁶Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Email: luiz.zafalon@embrapa.br ⁷Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Email: tania.dantas@embrapa.br

⁸Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Email: maria.edi@embrapa.br ⁹Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Email: carla.lange@embrapa.br (endereço para correspondência).

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um patógeno bacteriano responsável por diversas doenças em animais e no homem, e importante agente causador de mastite em bovinos. Vários fatores de virulência contribuem para a patogenicidade das infecções causadas por *S. aureus*. O conhecimento destes fatores de virulência é de fundamental importância para o controle da doença e alguns destes fatores têm sido considerados como possíveis componentes de vacinas contra a mastite estafilocócica. Dois destes fatores estão sendo considerados neste estudo, a produção de cápsula e a formação de biofilme. A cápsula é um componente da parede celular bacteriana, formada por polissacarídeos, que protege a bactéria contra a fagocitose. Os polissacarídeos capsulares dos tipos 5 e 8 são os predominantes nos isolados de *S. aureus* que causam infecções intramamárias, mas sua distribuição varia de acordo com a região geográfica. Biofilme compreende colônias microbianas envoltas por material viscoso e aderidas a uma superfície. No ambiente, as bactérias podem ser encontradas em estado livre ou associadas em biofilmes, que normalmente estão embebidos em uma matriz polimérica extracelular. Os polissacarídeos são os principais componentes dessa matriz, mas proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros polímeros também podem estar presentes. Os biofilmes protegem as bactérias das defesas do hospedeiro e da ação de quimioterápicos, e são a causa de infecções bacterianas persistentes e crônicas, incluindo a mastite bovina. O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de genes relacionados à produção de cápsula e de biofilme em *S. aureus* isolados de leite de vacas em rebanhos leiteiros das diferentes regiões geográficas brasileiras. Estas informações serão importantes para avaliar a pertinência de incorporação de polissacarídeos de ambos os componentes, cápsula e biofilme, em um futuro imunógeno apropriado ao nosso País.

Material e Métodos: Foram analisadas 134 amostras de *S. aureus* oriundas de quartos mamários de vacas, de propriedades leiteiras localizadas nas cinco regiões geográficas do país, coletadas entre janeiro de 2013 e junho de 2015. A coleta do leite e a identificação bacteriana foram realizadas de acordo com procedimentos preconizados pelo National Mastitis Council, em cinco diferentes Unidades Descentralizadas da Embrapa. As amostras de *S. aureus* isoladas foram enviadas à Embrapa Gado de Leite para a pesquisa dos genes relacionados à produção de cápsula e biofilme. A identificação da espécie *S. aureus* foi confirmada pela pesquisa do gene *femA*, realizada por PCR, conforme descrito anteriormente. A pesquisa dos genes relacionados à produção de cápsula (*cap5* e *cap8*), e à formação de biofilme (*icaA*, *icaD* e *bap*) também foi realizada por PCR. A extração de DNA total foi feita

utilizando-se fenol e clorofórmio, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e as quantidades ajustadas para a reação de PCR. As reações foram realizadas em termociclador e os fragmentos amplificados visualizados após eletroforese em gel de agarose. O registro das imagens foi feito em fotodocumentador. A pesquisa dos genes *cap* foi realizada de acordo com Camussone et al. (2012), com oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 361 e 173 pb, para *cap5* e *cap8*, respectivamente. As amplificações dos genes *icaA* e *icaD* foram realizadas de acordo com Vasudevan et al. (2003), com oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 1.315 e 381 pb, respectivamente. As amplificações do gene *bap* foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores *bap2*, descritos por Potter et al. (2009), que amplificam um fragmento de 598 pb, nas condições indicadas por estes autores.

Resultados e Discussão: Todos os isolados apresentaram um produto de amplificação de 132 pb do gene *femA*, confirmando a sua identificação como *S. aureus*. Dos 134 isolados analisados, 133 (99,2%) apresentaram o gene *cap*: 103 isolados (76,9%) apresentam o gene *cap5* e 29 isolados (21,6%) apresentaram o gene *cap8*. Somente um isolado não apresentou o gene *cap*. Houve predominância do genótipo *cap5* nos isolados de *S. aureus* analisados. Esta predominância se confirmou nos isolados oriundos das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Na região Sul, metade dos isolados apresentaram o genótipo *cap5* e outra metade, o genótipo *cap8*. Com relação aos genes envolvidos na formação de biofilme, 133 isolados (99,2%) apresentaram os genes *icaA* e *icaD* e 113 (84,3%) apresentaram o gene *bap*. Com relação aos genes *cap5*, *cap8*, *icaA* e *icaD*, as percentagens destes genes encontradas neste estudo são semelhantes às reportadas em estudos anteriores. Com relação ao gene *bap*, a percentagem de 84,3% encontrada neste estudo foi superior às percentagens reportadas por outros estudos, também realizados com *S. aureus* isolados de leite bovino.

Conclusões: Os resultados deste estudo indicam um alto potencial de patogenicidade apresentado por *S. aureus* isolados de leite bovino das cinco diferentes regiões do Brasil.

Agradecimentos: Os autores agradecem a valiosa colaboração dos colegas Dr. Wladimir Padilha da Silva, Dra. Maira Balbinotti Zanela, Dra. Maria Aparecida V. P. Brito, Dr. Amaury Apolônio de Oliveira, Kenia Moura Teixeira e Marcos Aurélio Souto Silva na coleta, identificação, envio e manutenção de amostras de *S. aureus* deste estudo.

Referências Bibliográficas:

Camussone C, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvinho LF. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. Braz J Microbiol. 2012; 43:1010-14.

Potter A, Ceotto H, Giambiagi-deMarval M, Santos KRN, Nes IF, Bastos MCF. The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. J Microbiol. 2009; 47:319-26.

Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol. 2003; 92:179-85.