

Resumo 64 - OCORRÊNCIA DE GENES DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE BOVINO¹.**OCCURRENCE OF VIRULENCE FACTORS GENES IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM BOVINE MILK SAMPLES¹.**

João Batista Ribeiro^{2*}; Paula dos Anjos Alvarenga³; Gabryella Russi Ribeiro⁴; Solon José de Oliveira Leite⁵; Letícia Caldas Mendonça⁶; Carla Christine Lange²; Alessandro de Sá Guimarães²; Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito²

¹Auxílio Pesquisa: FAPEMIG (CVZ-PPM-00406/14), CNPq (Processo 403098/2013-0), Embrapa (Cód. 02.13.14.001.00.02).

²Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. E-mail*: joao-batista.ribeiro@embrapa.br ³Graduanda em Ciências Farmacêuticas, SUPREMA, Juiz de Fora, Minas Gerais. ⁴Discente do Curso Técnico em Química, Colégio Pio XII, Juiz de Fora, Minas Gerais. ⁵Graduando em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

⁶Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Introdução: A mastite bovina, caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, é a doença de maior impacto para a produção de leite no mundo. *Staphylococcus aureus* é a bactéria mais frequentemente isolada em amostras de leite provenientes de vacas com mastite, sendo um agente contagioso e de difícil controle. A adesão dessa bactéria às células do hospedeiro e às proteínas da matriz extracelular é o primeiro passo para a colonização e estabelecimento da infecção. Diversas moléculas estão envolvidas nesse processo, incluindo o ácido teicóico e proteínas, como a proteína A (spA), clumping factors (ClfA e ClfB) e proteínas ligantes à fibronectina (FnBPA e FnBPB), ao colágeno (Cna), ao fibrinogênio (Efb), à vitronectina e à elastina (EbpS), e toxinas (Hla e Hlb) sendo todas essas moléculas imunologicamente importantes. Considerando a escassez de informações sobre a ocorrência de fatores de virulência em isolados de *S. aureus* de origem brasileira, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência dos genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hlb* em uma população da bactéria representativa de diversas regiões do País.

Material e Métodos: Foram utilizadas 174 cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de vacas clinicamente sadias das regiões Sudeste, Sul e Norte do Brasil mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa. As bactérias foram recuperadas em ágar BHI e cultivadas em 6 mL de caldo BHI sob agitação rotacional de 200 rpm a 35°C por 16 horas. A extração e purificação de DNA genômico foram realizadas com emprego de SDS, lisostafina e fenol/clorofórmio. Em seguida foi feita a quantificação e diluição do DNA para a concentração de 50 ng/μL. Para detectar os genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hlb* foram feitas reações para cada gene separadamente utilizando primers específicos na concentração de 0,25 μM em reações de 15 μL contendo dNTPs (0,25 mM), MgCl₂ (2,5 mM), tampão de PCR Promega (1X), Taq DNA polimerase Promega (0,05 U/μL) e DNA molde (1,0 ng/μL). As condições de amplificação foram: uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C, 53°C e 72°C por 30 segundos em cada temperatura, e uma etapa final de síntese a 72°C por 5 minutos (Ster et al., 2005). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose 2% (p/v) a 100V. Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídeo e a imagem do gel, fotodocumentada utilizando o sistema Eagle Eye II (Stratagene®). Foram consideradas portadoras dos genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hlb* as bactérias para as quais foi observada a presença de bandas únicas correspondentes a fragmentos de DNA de 132, 104, 194, 195 e 200 pb, respectivamente.

Resultados e Discussão: Observou-se, por inspeção visual das imagens dos géis de agarose, que 141 (81,03%), 144 (82,76%), 136 (78,16%), 120 (68,96%) e 135 (77,57%) das 174 cepas

de *S. aureus* utilizadas neste trabalho apresentaram bandas únicas correspondentes a fragmentos de DNA nos tamanhos esperados para os amplificadores dos genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hnb*, respectivamente. Foram identificadas 69 (39,65%) cepas portadoras dos cinco genes investigados simultaneamente e sete (4,02%) que não apresentaram nenhum dos genes analisados. A elevada prevalência destes genes nessa população de bactérias sugere que esses fatores de virulência são importantes para a patogenia das infecções intramamárias e persistência de *S. aureus* nos rebanhos brasileiros. Por outro lado, a existência de bactérias não portadoras desses genes nessa população sugere que nenhum desses fatores de virulência é essencial para a patogenia, uma vez que as cepas usadas neste trabalho foram isoladas de casos de infecção intramamária bovina. Klein et al (2013) relataram frequências de 91,8, 63,5 e 50,6% para os genes *clfB*, *fnbA* e *clfA*, respectivamente, em um grupo de 85 cepas de *S. aureus* isolados de amostras de leite provenientes dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. As frequências dos genes *fnbA* e *clfA* observadas no presente trabalho são consideravelmente maiores do que as relatadas por Klein et al (2013) enquanto que o gene *clfB* teve maior ocorrência na população de *S. aureus* investigada por aqueles autores. Essas diferentes frequências gênicas podem estar relacionadas à diferença de abrangência do presente trabalho, que incluiu cepas representativas de bacias leiteiras de diferentes regiões do País, não contempladas naquele estudo. Outro aspecto que deve ser ressaltado é que a presença do gene não garante que o mesmo esteja sendo expresso, por isso, são necessários ainda estudos com foco na expressão desses genes nessa população bacteriana visando à obtenção de respostas mais conclusivas sobre a contribuição das adesinas codificadas por esses genes na persistência de *S. aureus* em rebanhos brasileiros. Vale mencionar que Klein et al. (2013) observaram atividade transcricional, por meio da técnica de PCR em tempo real, nos genes analisados (*clfB*, *fnbA*, *spa* e *sdrC*) em nove cepas representativas da população de *S. aureus* (n=85) estudada, sugerindo que os mesmos são funcionais na maioria dos isolados. Estudos adicionais serão realizados visando à discriminação subespecífica desses isolados e algumas das cepas portadoras dos genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hnb* serão escolhidas para isolar, caracterizar, editar, expressar e purificar domínios das proteínas responsáveis por sua ligação à matriz extracelular do hospedeiro visando o desenvolvimento de estratégias para o controle e prevenção da mastite bovina.

Conclusões: Os genes *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *hla* e *hnb* foram detectados, respectivamente, em 81,03; 82,76; 78,16; 68,96 e 77,57% das 174 cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino provenientes das regiões Sudeste, Sul e Norte do Brasil. Em quatro por cento das cepas nenhum dos genes investigados foi detectado e quase 40% da população bacteriana sob estudo foi identificada como portadora dos cinco genes. A alta prevalência desses genes sugere relevância das respectivas proteínas no processo de infecção da glândula mamária bovina por *S. aureus*, podendo contribuir para a persistência dessa bactéria nos rebanhos leiteiros. Por outro lado, a ocorrência de cepas desprovidas de todos os genes investigados indica que esses não são essenciais para a patogenia da doença.

Referências Bibliográficas:

Klein RC, Fabres-Klein HM, Brito MAVP, Fietto GL, Ribon BOA. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. Vet. Microbiol., 2012; 160:183-8.

Ster C, Gilbert FB, Cochard T, Poutrel B. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. Mol. Cell. Probes, 2005; 19, 227–35.