

RELAÇÃO ENTRE SLIME LAYER E *icaA* EM *Staphylococcus* spp.

**CLEOMAR DA SILVA¹; MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA²; RODRIGO
CASQUERO CUNHA³; SÍLVIA REGINA LEAL LADEIRA⁴; MARIA ELISABETH
AIRES BERNE⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – cleos@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – micha.hornes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – s.ladeira@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus spp. são bactérias esféricas, do grupo dos cocos Gram positivos, que podem provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS, 2007). São bactérias comuns no microbioma da pele dos mamíferos, sendo, também, frequentemente isoladas de leite, carne e outros produtos alimentares tais como queijos e salsichas, podendo, inclusive, serem isoladas do ambiente (KLOOS; SCHILEFEIR, 1986; TALON et al. 2002; PLANCHON et al., 2006).

Slime layer (SL) é uma camada extra capsular, fracamente imunogênica e de estrutura lâbil que é perdida ou parcialmente perdida em subculturas *in vitro* (AGUILAR et al., 2001). A produção de SL foi detectada também em cepas isoladas de mastite em seres humanos e ruminantes. Bactérias produtoras de SL são consideradas como tendo aumento da capacidade de colonizar tecidos do hospedeiro e uma melhor proteção contra a fagocitose (ARSLAN; ÖZKARDES, 2007).

A expressão de N-acetylglucosaminiltransferase, codificada pelo gene *icaA*, presente no locus *ica*, está relacionada com a produção de SL em *S. aureus* (CRAMTON et al., 1999).

O objetivo do presente estudo foi padronizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) e analisar se houve relação entre a presença do gene *icaA* (genótipo) e a produção de SL (fenótipo) em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas no Laboratório Regional de Diagnósticos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

2. METODOLOGIA

Origem dos isolados: Foram analisadas 49 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo estas isoladas de: mastite bovina; otite canina; lesões, nódulos ou crostas em pele e narinas caninas; dermatite canina; osteomielite canina; lavado traqueal equino; queijo; ATCC; pele de cão; FDA; pizza; e suínos.

Teste de slime layer: Para a detecção de SL fez-se o teste de semeadura em placas de ágar vermelho do congo. (CRA; 3,7% de BHI - *Brain Heart Infusion*; 1,5% de ágar base, 5% de sacarose e 0,08% de vermelho do congo).

Extração de DNA: O DNA total de cada isolado foi extraído pelo método de extração por fenol clorofórmio (SANBROOK et al, 1989) para análise genotípica da presença de genes relacionados com a formação de slime layer. O DNA extraído foi quantificado em aparelho *GE Healthcare NanoVue Plus™*.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): Foi realizada PCR convencional nas seguintes condições: 2,5 µL de tamapão 10 x, 1 U de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen™), 4 pmol de DNTP, 0,4 pmol de cada primer, 20 µg de DNA total e água ultra pura q.s.p. 25 µL de volume final.

A termociclagem foi estabelecida como: 92 °C por 5 minutos, 30 ciclos à 92 °C por 45 segundos, 49 °C por 45 segundos e 72 °C por 1,5 minutos, encerrado a reação com 72 °C por 5 minutos. O Primer utilizado foi o *icaA-F* (5'-CCT AAC TAA CGA AAG GTA G-3') e *icaA-R* (5'-AAG ATA TAG CGA TAA GTG C -3').

Padronização das amostras: A padronização das amostras foi realizada seguindo-se critério de melhor resultado positivo na amplificação, o qual foi obtido a partir de amostras de DNA com quantificação de 20 µg/mL de DNA. Dessa maneira, todas as outras amostras foram diluídas a esta concentração, com o objetivo de evitar que quantidade excessiva de DNA nas amostras inibisse a PCR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa o aspecto fenotípico de isolados negativo e positivo após semeadura em CRA e, na Figura 2, é mostrado o perfil de amplificação de *icaA* em isolados positivos e negativos, para a presença do mesmo.

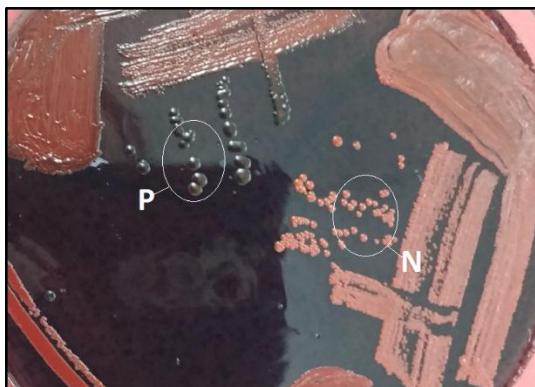


Figura 1. Amostras semeadas em CRA. N = colônia não produtora de SL; P = colônia produtora de SL

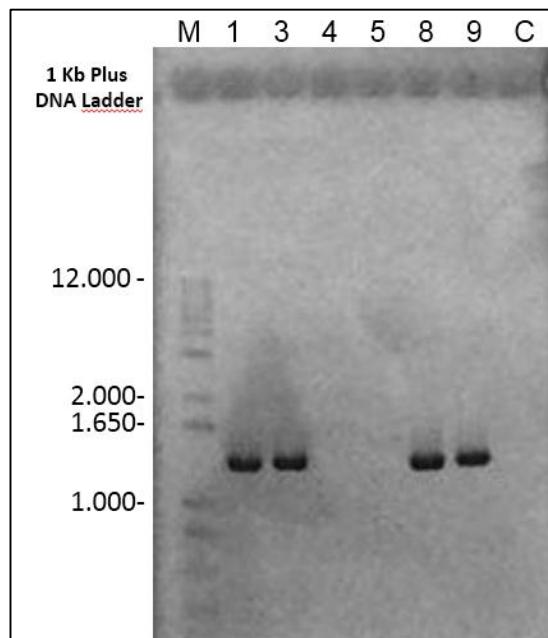


Figura 2. Gel de agorose 1%, onde: M) marcador; C) controle negativo; 1, 3, 8 e 9) Amostras positivas; 4 e 5) Amostras negativas.

De todas as amostras estudadas, 18 foram fenotipicamente produtoras de SL e apenas 5 amostras, todas de *S. aureus*, foram positivas a detecção do gene *icaA*. Destas últimas, três foram positivas tanto para SL quanto para a presença de *icaA*, enquanto que, as outras duas apresentaram reação positiva para PCR, porém negativa para SL. As outras 15 amostras positivas para SL foram negativas para PCR (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes realizados, sendo: N = amostra negativa; P = positiva

Amostra	Gênero/Espécie	Origem	SL	<i>icaA</i>
01s	<i>S. aureus</i>	Mastite bovina	N	N
02s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	N	N
03s	<i>S. pseudointermedius</i>	Otite canina	N	N
04s	<i>S. intermedius</i>	Lesão de pele canina	P	N
05s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	N	N
06s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	N	N
07s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	P	N
08s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	N	N
09s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	P	N
10s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	P	N
11s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite bovina	P	N
12s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Lesão de narina canina	P	N
13s	<i>S. intermedius</i>	Crosta de pele canina	N	N
14s	<i>S. sheleiferi</i>	Otite canina	P	N
15s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Dermatite canina	N	N
16s	<i>S. aureus</i>	Lavado traqueal equino	N	N
17s	<i>S. intermedius</i>	Osteomielite canina	N	N
18s	<i>S. pseudointermedius</i>	Nódulos de pele canina	N	N
19s	<i>Staphylococcus sp.</i>	Otite canina	N	N
20s	<i>S. aureus</i>	Mastite bovina	N	N
21s	<i>S. pseudointermedius</i>	Mastite bovina	N	N
01r	<i>S. aureus</i>	Queijo	P	P
02r	<i>S. aureus</i>	Queijo	P	N
03r	<i>S. aureus</i>	Queijo	P	P
04r	<i>S. aureus</i>	ATCC	P	N
05r	<i>S. aureus</i>	Queijo	P	N
06r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	N
07r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	N
08r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	P
09r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	P
10r	<i>S. aureus</i>	FDA	N	N
11r	<i>S. aureus</i>	Pizza	N	N
12r	<i>S. hyicus</i>	Suíno	N	N
13r	<i>S. epidermidis</i>	Mastite bovina	N	N
14r	<i>S. Intermedius</i>	Cão	N	N
15r	<i>S. epidermidis</i>	Mastite bovina	N	N
16r	<i>S. aureus</i>	Otite canina	P	N
17r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	N
18r	<i>S. hyicus</i>	Suíno	N	N
19r	<i>S. Intermedius</i>	Cão	N	N
20r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	N
21r	<i>S. aureus</i>	Otite Cão	P	N
22r	<i>S. aureus</i>	Otite Cão	P	N
23r	<i>S. epidermidis</i>	Mastite bovina	N	N
24r	<i>S. epidermidis</i>	Mastite bovina	N	N
25r	<i>S. aureus</i>	Pele de cão	N	N

26r	<i>S. aureus</i>	Otite canina	P	P
27r	<i>S. aureus</i>	FDA	P	N
28r	<i>S. aureus</i>	ATCC	P	N

O resultado final das análises da PCR pós padronização mostrou bandas mais fortes e mais concentradas. Com uma menor concentração de DNA na amostra (20 µg/mL), houve uma melhor definição da amplificação do gene estudado.

4. CONCLUSÕES

Em função da detecção de poucas amostras com *icaA*, não foi possível determinar a relação da presença do gene com a produção de SL. A padronização da PCR foi fundamental para melhorar o resultado final das análises, proporcionando bandas mais definidas e com maior intensidade à UV.

Com o objetivo de aumentar a amostragem, estão sendo realizados mais testes fenotípicos para SL e genotípicos para *icaA*, além de outros genes, como o *icaD*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 183-191, 2001.
- ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. Slime production and antibiotics susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 29-33, 2007.
- CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**. v. 67 (10), p. 542-5433, 1999.
- PLANCHON, S.; et al. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109, p. 88-96, 2006.
- KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus *Staphylococcus* (Rosenbach, 1884), 18AL. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 1013-1035, 1986.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, v. 3. 2 ed. p. 215, 1989.
- SANTOS, A. L.; et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- TALON, R.; LEROY, S.; FADDA, S. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In: TOLDRA, F. (Ed.), **Research Advances in Quality of Meat and Meat Products. Vol. Chapter 10**, Research Signpost, p. 175–191, 2002.