

IMPLANTAÇÃO DE NOVAS METODOLOGIAS NA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS A PARTIR DE AMBIENTE DE PRODUÇÃO LEITEIRA

Mirella Trindade Silva¹; Cassia Couto da Motta²; Anna Carolina Coelho Marín Rojas² & Miliane Moreira Soares de Souza³

1. Bolsista PIBIC, Discente do Curso de Medicina Veterinária, DMIV/IV/UFRRJ; 2. Médica Veterinária, MCsVs. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias UFRRJ, 3. Médica Veterinária, PhD. Professora DMIV/IV/UFRRJ.

Palavras-chave: Identificação fenogenotípica, MALDI –TOF MS, *Staphylococcus* spp.

Introdução

Staphylococcus spp. está entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina, provocando significativas perdas econômicas para os produtores de leite e derivados. A identificação fenotípica desses agentes é amplamente usada para a classificação dos grupos e das relativas espécies, porém são técnicas laboriosas e demoradas e podem apresentar subjetividade e imprecisão, sendo necessária a utilização de ferramentas moleculares para uma identificação rápida e precisa (MOTTA, 2014; ROJAS, 2014).

O projeto teve por objetivo identificar genotipicamente espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de ambiente de produção leiteira, e a validação dessa identificação a partir da técnica MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz), técnica padrão-ouro, bem como analisar pontos críticos na execução das técnicas de caracterização genotípicas utilizadas.

Metodologia

Foram coletadas 512 amostras de leite e 33 amostras da linha de ordenha, gerando um total de 288 isolados de *Staphylococcus* spp. identificados fenotipicamente de acordo com Koneman (KONEMAN et al., 2008).

Para a identificação genotípica das espécies, o DNA bacteriano foi extraído seguindo protocolo desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ e submetido a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). Para identificação de *Staphylococcus aureus* foram utilizados *primers* específicos para detecção dos genes: 23S *rDNA* (1250 pb), *coa* (variável) e *nuc* (279 pb). Foi realizado também PCR *multiplex* (M-PCR) do gene *nuc* para identificação de outros *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Para identificar *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, a partir amplificação do gene *groEL*. A enzima utilizada foi a endonuclease de restrição AluI. Para todas as reações os respectivos controles positivos foram utilizados.

Após a identificação fenogenotípica, alguns isolados foram submetidos à análise proteômica MALDI-TOF, no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da UFRJ (Instituto de Microbiologia Paulo Góes).

Resultados e Discussão

A identificação fenotípica revelou que de um total de 288 *Staphylococcus* spp., 49,65% (143/288) foram identificados como *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECPs) e destes, 89,5% (128/143) foram *Staphylococcus aureus*. Os 10,5% (15/143) restantes foram identificados somente como ECPs.

Os outros 50,35% (145/288) foram fenotipicamente identificados como *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECNs) e classificados em 13 espécies distintas. A espécie prevalente foi *Staphylococcus chromogenes* 63,45 % (92/145). Já *S. schleiferi subsp. schleiferi* 0,68 % (1/145) foi a menos encontrada. Foram encontradas ainda *S. sciuri* 6,9 % (10/145), *S. xylosum* 5,51 % (8/145), *S. lugdunensis* 4,83 % (7/145), *S. simulans* 3,45 % (5/145), *S. hyicus* 3,45 % (5/145), *S. auricularis* 3,45 % (5/145), *S. warneri* 2,76 % (4/145), *S. epidermidis* 2,1 % (3/145), *S. haemolyticus* 1,37 % (2/145), *S. hominis* 1,37 % (2/145) e *S. cohnii* 0,68 % (1/145).

Os resultados obtidos a partir das técnicas de PCR e M-PCR mostraram que 97,9% dos ECPs obtidos eram *Staphylococcus aureus* (140/143), confirmando sua prevalência,

importância e patogenicidade na etiologia das mastites (LANGE et al. 2011). Os 2,1% (3/143) restantes eram outros ECPs, sendo 1 identificado como *S. intermedius*. Os outros 2 não amplificaram, assim como a cepa padrão *S. hyicus* 5368. Esses resultados mostram a de *S. aureus*

A identificação proteômica permitiu que 33 isolados, escolhidos aleatoriamente e identificados genotipicamente como *S. aureus*, fossem confirmados como *S. aureus*. Os três isolados, anteriormente identificados somente como ECPs, foram identificados pelo MALDI-TOF MS, como dois isolados de *S. hyicus* e um de *S. intermedius*.

A identificação genotípica de ECNs pelo PCR-RFLP, possibilitou a identificação de 85,5% (124/145) dos isolados. A espécie prevalente foi *S. chromogenes* 57,95 % (84/145) seguida por *S. xylosus* 6,9 % (10/145), *S. sciuri* 6,9 % (10/145), *S. warneri* 3,45 % (5/145), *S. epidermidis* 2,75 % (4/145), *S. hominis* 2,07 % (3/145), *S. haemolyticus* 1,37 % (2/145), *S. simulans* 1,37 % (2/145), *S. cohnii* 1,37 % (2/145) e *S. lugdunensis* 1,37 % (2/145). Entretanto, em 14,5% (21/145) não foi possível a identificação genotípica.

Os 21 isolados não identificados e 40 isolados escolhidos aleatoriamente foram 100% identificados pela técnica MALDI-TOF MS. Novamente a espécie prevalente foi de *S. chromogenes* 70,5 % (43/61). As demais espécies identificadas foram: *S. sciuri* 6,5 % (4/61), *S. warneri* 5 % (3/61), *S. xylosus* 3,3 % (2/61), *S. epidermidis* 3,3 % (2/61), *S. hominis* 3,3 % (2/61), *S. hyicus* 3,3% (2/61), *S. simulans* 1,6 % (1/61), *S. lugdunensis* 1,6 % (1/61) e *S. auricularis* 1,6 % (1/61). Os 21 isolados que não puderam ser identificados pelo PCR-RFLP foram identificados como: *S. chromogenes* (17/21), *S. hyicus* (2/21), *S. warneri* (1/21) e *S. auricularis* (1/21).

Houve concordância entre os resultados obtidos pelo PCR-RFLP e pelo MALDI-TOF MS, porém a técnica proteômica apresentou maior sensibilidade, possibilitando a identificação de todos os isolados. Mesmo assim, o PCR-RFLP do gene *groEL* provou ser uma ferramenta adequada para a identificação de patógenos estafilocócicos em bovinos, independentemente de suas características fenotípicas (SANTOS et al., 2008).

Conclusão

As identificações realizadas a partir de técnicas genotípicas apresentaram significativa correlação com a identificação proteômica, tanto para as espécies de ECPs quanto para ECNs, apresentando compatibilidade de 100% e níveis de segurança satisfatórios, propiciando um resultado fidedigno, o que permitirá melhores medidas preventivas, melhorando a sanidade em rebanhos leiteiros, levando inovação tecnológica ao campo.

Referências Bibliográficas

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, J.R. Koneman Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed. 1565p. Tradução/revisão técnica: Eiler Fritsch. 2008.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

MOTTA, C. C. D. Análise genotípica e proteômica na identificação de *Staphylococcus* spp. Coagulase-positivos isolados do leite e sua cadeia produtiva e caracterização da resistência a beta-lactâmicos. 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2014.

ROJAS, A. C. C. M. *Staphylococcus* spp. coagulase –negativos em unidades leiteiras: identificação fenogenotípica e proteômica e análise da resistência Antimicrobiana. 2014. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2014

SANTOS, L.L., COSTA, G.M., PEREIRA, U.P., SILVA, M.A., SILVA, N. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. Revista do Instituto Adolfo Lutz. v. 70, p.1-7, 2011.