

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

NOVA PROPOSTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DO OPERON ICA EM STAPHYLOCOCCUS AUREUS

¹ Helga Delgado Monteiro (bolsista IC-UNIRIO); ¹ Carmen Soares de Meirelles Saramago (Pesquisador); ² Maria José de Souza (Pesquisador/Colaborador); ¹ Agostinho Alves de Lima e Silva (Pesquisador); ¹ Renato Geraldo da Silva Filho (Pesquisador); ¹ Rubens Clayton da Silva Dias (orientador).

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio: UNIRIO

Palavras-chave: Staphylococcus aureus; biofilme; operon ica.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus são encontrados na microbiota normal da pele e nas membranas mucosas de humanos, outros mamíferos e pássaros (CHILLER et al., 2001). Contudo, um desequilíbrio da microbiota pode levar a uma variedade de infecções comunitárias e infecções associadas aos cuidados com a saúde (BANNERMAN, 2003). Não apenas *Staphylococcus epidermidis* mas também *S. aureus* têm sido frequentemente associados às infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, devido à sua capacidade de aderência a biomateriais formando uma película de bactérias conhecida como biofilme (CERCA et al., 2005; KNOBLOCH et al., 2002). O biofilme pode ser definido como uma comunidade bacteriana inserida em uma matriz polimérica extracelular produzida por estas bactérias, que cresce aderida a superfícies biológicas ou inertes (DONLAN & COSTERTON, 2002). A composição química do principal polissacarídeo presente no biofilme produzido por estafilococos é formada por uma homoglicana linear composta de glicosaminoglicana, β -1,6-ligada (PNAG), denominado adesina polissacarídica intercelular (PIA) (MACK et al., 1996). A síntese de PIA ocorre a partir de produtos codificados pelo operon *icaR*ADBC, primeiramente identificado em *S. epidermidis* (HEILMANN et al., 1996a), e que também está presente em *S. aureus* (CRAMTON et al., 1999).

OBJETIVO

Os objetivos do presente estudo são a proposta e avaliação de novos oligonucleotídeos iniciadores para detecção dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR* do operon *ica* em amostras de *S. aureus*, determinar a frequência de tais genes e comparar os achados moleculares com os dados obtidos nos ensaios de biofilme em ágar vermelho congo (AVC).

METODOLOGIA

Foram avaliadas amostras de *S. aureus* provenientes de dois diferentes grupos de amostras: (i) amostras isoladas da cavidade nasal de portadores saudáveis e (ii) amostras provenientes de processos infecciosos. As amostras provenientes de portadores foram identificadas através de métodos convencionais, segundo Bannerman (2003). As amostras clínicas foram previamente identificadas no laboratório de origem, no HSE, através do sistema MicroScan WalkAway (Dade MicroScan, Inc., Sacramento, CA, EUA). Todas as amostras previamente identificadas como *S. aureus*, através de testes fenotípicos, foram reavaliadas através de PCR simples para confirmação de sua identificação, conforme Martineau e colaboradores (1998). A produção de biofilme foi avaliada a partir da observação das características coloniais das amostras bacterianas cultivadas em AVC (SOUZA et al., 2012). Novos iniciadores específicos para *S. aureus* foram desenhados como proposta para detecção dos genes *icaR*, *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, e amplificação de todo o operon através da técnica de PCR. Para tal fim, todas as sequências completas do operon *ica* de amostras de *S. aureus* disponíveis no "GenBank database" até agosto de 2012 foram baixadas e utilizadas para o desenho dos novos iniciadores (GenBank accession # NC_010079, # NC_002745, # NC_002758, # NC_002952, # NC_002953, # NC_009641). A sequência completa do operon *ica* da cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516 (GenBank accession # NC_010079) foi utilizada para o mapeamento de todos os cinco genes que o compõem com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.5.3 (HALL, 1999). As sequências do operon obtidas foram alinhadas com o auxílio da ferramenta ClustalW Multiple Alignment do programa BioEdit, tendo-se como sequência base aquela utilizada para construção do mapa genético. Uma vez os operons alinhados, as sequências completas de cada gene que os compõem (*icaR*, *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) foram extraídas para um novo alinhamento e análise de regiões consenso que pudessem permitir o desenho de iniciadores compatíveis com as sequências das diferentes amostras. Com os novos alinhamentos, um novo par de iniciadores foi desenhado para cada gene. Posteriormente, cada iniciador teve sua compatibilidade avaliada individualmente e aos pares, incluindo o grau de complementariedade, magnitude das diferenças de temperaturas de fusão (T_m – "melting temperature") e a tendência ao anelamento entre si e aos pares, com base na energia livre de Gibbs resultante da associação entre eles. Em seguida, cada novo par de iniciadores teve sua especificidade e eficiência testadas através da análise in silico contra as sequências dos genomas completos das cepas descritas anteriormente. A análise dos novos iniciadores mostrou algumas compatibilidades e a possibilidade de se utilizar algumas combinações para amplificação também dos loci *icaADBC* e *icaR*ADBC. Os novos iniciadores foram então adquiridos e utilizados para padronização das reações de PCR e avaliação da amplificação de produtos de PCR específicos, que variaram de 271pb a 531pb. Todas as amostras bacterianas foram avaliadas através de PCR simples com o propósito de detectar os genes que compõem o operon *ica*, utilizando-se os novos

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

iniciadores. Para a realização das reações de PCR, o DNA total das amostras bacterianas foi extraído por lise térmica segundo Dias e colaboradores (2008). Como análise estatística dos resultados, as diferenças entre os grupos estudados foram avaliadas utilizando-se o teste do Qui-quadrado, teste exato de Fisher bicaudal ou o teste t de Student. Foram considerados como estatisticamente significativos os resultados que revelaram valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 30 amostras de *S. aureus* de dois diferentes grupos, foi incluído no presente estudo: (i) 20 amostras de portadores isoladas da cavidade nasal de estudantes saudáveis da área de saúde e (ii) 10 amostras clínicas, proveniente de processos infecciosos, obtidas no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE). Todas as 30 amostras bacterianas, tanto de portadores quanto às clínicas, tiveram sua identificação confirmada através de teste molecular. A avaliação das características coloniais a partir de cultivo em AVC permitiu classificar as amostras do presente estudo como positivas ou negativas para produção de biofilme (SOUZA et al., 2012). Vinte e uma (70%) das 30 amostras incluídas no estudo apresentaram resultado positivo para biofilme, sendo 14 (70%) das 20 amostras de portadores e sete (70%) das 10 de infecção. Dentre as amostras de portadores, a presença de pelo menos um dos cinco genes do operon foi mais frequente nas AVC positivas ($p = 0,018$), enquanto que nas amostras clínicas, a presença de pelo menos um dos cinco genes foi observada em todas as amostras, tanto AVC positivas quanto negativas (Tabela 1). Os cinco genes que compõem o operon *ica* foram detectados na maioria das amostras clínicas, destacando-se *icaB* que foi mais frequentemente observado nas amostras AVC positivas ($p = 0,008$) (Tabela 1). Por outro lado, entre as amostras de portadores, essa alta frequência foi observada apenas nas amostras AVC positivas, destacando-se *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR*, que foram mais frequentemente observados nas amostras AVC positivas ($p \leq 0,018$). Todas as amostras clínicas (AVC positivas e AVC negativas) foram positivas para os genes *icaA*+*icaD*, enquanto apenas 50% das amostras AVC positivas de portadores apresentaram tais genes.

Tabela 1. Associação entre a presença dos genes *icaRADBC* e a produção de biofilme em em ágar vermelho congo em amostras de *Staphylococcus aureus* de infecção e de mucosa de portadores saudáveis.

Genes <i>icaRADBC</i>	Amostra Clínica			Amostra de Portador		
	AVC + (n = 7)	AVC – (n = 3)	<i>p</i>	AVC + (n = 14)	AVC – (n = 6)	<i>p</i>
<i>icaA</i> + <i>icaD</i>	6 (86)	3 (100)	1,000	7 (50)	0	0,051
<i>icaA</i>	6 (86)	3 (100)	1,000	7 (50)	0	0,051
<i>icaB</i>	7 (100)	0	0,008	11 (79)	1 (17)	0,018
<i>icaC</i>	2 (29)	3 (100)	0,166	9 (64)	0	0,014
<i>icaD</i>	6 (86)	3 (100)	1,000	9 (64)	0	0,014
<i>icaR</i>	3 (43)	3 (100)	0,200	9 (64)	0	0,014
<i>icaRADBC</i> ^a	7 (100)	3 (100)	-	11 (79)	1 (17)	0,018

AVC +: amostra produtora de biofilme em ágar vermelho congo; AVC –: amostra não produtora de biofilme em ágar vermelho congo.

^aPresença de pelo menos um dos cinco genes do operon *ica*.

A análise de sequências completas do operon *ica* de diferentes amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis* (amostra RP62A GenBank accession # CP_000029) nos permitiu localizar alguns “mismatches” entre as sequências de *S. aureus* e iniciadores amplamente utilizados para detecção de seus genes (*icaR*, *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*) (Arciola et al., 2004; de Silva et al., 2002; Ziebuhr et al., 1999). De fato, Rohde e colaboradores (2001), avaliando a correlação do genótipo *icaRADBC* e sua expressão em *S. aureus*, constataram que os iniciadores utilizados por Arciola e colaboradores (2001) na análise de amostras de *S. aureus* não eram adequados, pois apresentavam alguns “mismatches”. Tais “mismatches” eram devido aos iniciadores terem sido desenhados para *S. epidermidis*. Assim, isso explicaria o fato desses estudos detectarem um baixo percentual de amostras de *S. aureus* apresentando o operon *icaRADBC*. Os novos pares de iniciadores mais adequados para *S. aureus* desenhados e propostos pelo presente estudo têm sido utilizados com sucesso até o momento; afirmação esta corroborada pelas análises e resultados já obtidos, e também pela negatividade observada nas reações de PCR realizadas com amostras de *S. epidermidis* como controle negativo de espécie não-específica. A maioria das amostras clínicas de *S. aureus* possui o operon *icaRADBC* (Fitzpatrick, Humphreys & O’Gara, 2006; Fitzpatrick, Humphreys & O’Gara, 2005). Contudo, alguns estudos têm detectado percentuais *icaA*+*icaD* muito abaixo do esperado, variando de 4% a 61% (Diamond-Hernández et al., 2010; Arciola, Baldassarri & Montanaro, 2001). Embora os resultados do presente estudo sejam muito preliminares, pudemos observar que 100% das amostras clínicas já avaliadas apresentaram pelo menos um dos cinco genes que compõem o operon. A detecção dos genes *icaA* e *icaD* simultaneamente representou >85% das amostras avaliadas. Acreditamos que os percentuais tão baixos descritos na literatura sejam devido a tais trabalhos estarem utilizando iniciadores desenhados para *S. epidermidis* em amostras de *S. aureus*. No presente estudo, a presença do operon *ica* foi observada entre amostras AVC negativas. Tais observações sugerem que a mudança fenotípica pode estar sendo causada por uma deleção do operon *ica* ou por sua inativação através da inserção da sequência de inserção bacteriana IS256 em diferentes posições do operon, que pode atuar positiva ou negativamente, dependendo de sua posição no mesmo (Ziebuhr et al., 1999). Sabe-se que esse elemento de inserção pode ser responsável

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

por até 33% da porção ativada do operon que permite sua expressão (Cafiso et al., 2004; Cramton et al., 2001; Dietrich et al., 2000; Ziebuhr et al., 1997). Embora a maioria das amostras clínicas de *S. aureus* possua o operon icaRADBC e o expressem sob diversas condições de crescimento, muitas são incapazes de formar biofilme sob as mesmas condições (Fitzpatrick, Humphreys & O'Gara, 2006; Fitzpatrick, Humphreys & O'Gara, 2005). Ainda no presente estudo, a presença do operon icaRADBC foi significativamente mais observada entre as amostras clínicas do que nas amostras de portadores (icaA + icaD: $p = 0,006$; icaA: $p = 0,006$; icaD: $p = 0,023$; pelo menos um dos cinco genes: $p = 0,028$). Tal observação indica o importante papel do locus ica como marcador de virulência para amostras clínicas de estafilococos. Sua presença em um alto percentual de amostras clínicas e sua associação com a habilidade das amostras em produzir biofilme sugerem o papel de icaA e icaD nos mecanismos de patogenicidade dos processos infecciosos. A análise de um maior número de amostras encontra-se em andamento. Acreditamos que esses novos resultados irão reforçar nossas observações. Além disso, pretendemos ainda comparar os resultados obtidos dessas novas propostas de iniciadores com aqueles provenientes da análise realizada com os iniciadores amplamente utilizados na literatura. A análise do operon ica através de iniciadores mais adequados para *S. aureus* nos permitirá elucidar se os baixos percentuais de detecção para os genes do operon ica descritos na literatura são reais ou se os iniciadores utilizados são realmente inadequados a ponto de comprometer os resultados já descritos na literatura até os dias de hoje.

CONCLUSÃO

Novos pares de iniciadores espécie-específicos para detecção dos genes icaA, icaB, icaC, icaD e icaR, que compõem o operon ica, foram propostos e vêm sendo utilizados com sucesso em *S. aureus*. Todas as amostras clínicas de *S. aureus* foram positivas para os genes icaA+icaD, com exceção de apenas uma amostra AVC positiva. Cem por cento das amostras clínicas apresentaram pelo menos um dos cinco genes que compõem o operon ica. A presença do operon ica nas amostras clínicas foi elevada e não mostrou diferenças, quando comparadas as amostras AVC positivas e AVC negativas, com exceção de icaB que foi mais frequentemente observado nas amostras AVC positivas. A presença do operon ica nas amostras de portadores foi observada numa menor frequência, em relação às amostras clínicas, e apenas entre as amostras AVC positivas, com exceção de uma única amostra AVC negativa que apresentou icaB.

REFERÊNCIAS

- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2151-2156, 2001.
- ARCIOLA, C.R. et al. Search for the insertion element IS256 within the ica locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials.*, 25: 4117-4125, 2004.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grown aerobically*. In: Manual of Clinical Microbiology, Murray, P.R.; Barron, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C. (eds), 8th ed, ASM Press. Washington, DC, USA, 2003, p.384-404.
- CAFISO, V. et al. Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 1081-1088, 2004.
- CRAMTON, S.E. et al. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.*, 67: 5427-5433, 1999.
- CRAMTON, S.E. et al. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, 69: 4079-4085, 2001.
- CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res. Microbiol.*, 156: 506-514, 2005.
- CHILLER, K.; SELKIN, B.A.; MURAKAWA, G.J. Skin microflora and bacterial infection of the skin. *J. Invest. Dermatol. Simp. Proc.*, 6: 170-174, 2001.
- DE SILVA, G.D.I. et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 382-388, 2002.
- DIAS, R.C.S. et al. Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 60: 79-87, 2008.
- DIEMOND-HERNÁNDEZ, B. et al. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect. Dis.*, 10: 68, 2010.
- DIETRICH, M. et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.*, 68: 3799-3807, 2000.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms, survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 167-193, 2002.
- FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 1973-1976, 2005.
- FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Hosp. Infect.*, 62: 120-122, 2006.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95, 1999.
- HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.*, 20: 1083-1091, 1996.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- KNOBLOCH, J. K. et al. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49: 683-687, 2002.
- MARTINEU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 618-623, 1998.
- MACK, D. et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.*, 178: 175-183, 1996.
- ROHDE, H. et al. Correlation of *Staphylococcus aureus* icaA/BC Genotype and Biofilm Expression Phenotype. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4595-4596, 2001.
- SOUZA, I.S. et al. Detecção de biofilme estafilocócico por teste fenotípico em ágar vermelho congo modificado. In: XI Jornada de Iniciação Científica, UNIRIO, 2012, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, v. 1, 2012.
- ZIEBUHR, W. et al. Detection of the intercellular adhesin gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.*, 65: 890-896, 1997.
- ZIEBUHR, W. et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.*, 32:345-356, 1999.