

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS – PRESENÇA DOS GENE CAPB EM AMOSTRAS CLÍNICAS E SUA RELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE BIOFILME E ÁCIDO POLI-GAMA-DL-GLUTÂMICO

¹ Ana Carolina Almeida Campos (bolsista IC-UNIRIO); ¹ Dr. Agostinho Alves de Lima e Silva; ¹ Dra. Carmen Soares de Meirelles Saramago; ¹ Dra. Cleonice de Alves Bento; ³ Dra. Maria José de Souza; ¹ Prof. Renato Geraldo da Silva Filho (orientador).

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

2 - Instituto Oswaldo Cruz; Fundação Instituto Oswaldo Cruz

3 - Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE)

Palavras-chave: Staphylococcus epidermidis, capB, PGA.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus epidermidis é uma das principais espécies bacterianas isoladas dos epitélios do homem. Considerada tipicamente saprófita, emergiu nas últimas décadas como uma das principais causas de infecções associadas à assistência à saúde ligadas à utilização de dispositivos médicos implantados como cateteres venosos centrais, próteses articulares e de válvulas cardíacas, marca-passos, derivações de fluido cefalorraquidiano e lentes intra-oculares (ZIEBUHR et al., 2006). Diferentemente de outros patógenos, S. epidermidis possui um conjunto limitado de fatores de virulência, sendo a capacidade de aderir a superfícies de biomateriais e a formação de biofilme os primeiros a serem reconhecidos. Biofilmes são aglomerações bacterianas, inseridas em uma matriz extracelular e organizadas em multicamadas, estrutura que oferece proteção aos mecanismos imunológicos de defesa e a antibióticos (FEY; OLSON, 2010). Apesar de ser um importante patógeno oportunista, S. epidermidis possui poucos genes que podem ser correlacionados à sua patogenicidade, não sendo encontrados nesta espécie os numerosos fatores de virulência relacionados a invasividade e produção de toxinas observados em S. aureus (FEY; OLSON, 2010). No entanto, destaca-se em S. epidermidis a presença do operon cap responsável pela produção do ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), composto já descrito em outras bactérias Gram positivas, particularmente do gênero Bacillus, estando nas espécies não patogênicas relacionado com a sobrevivência em condições ambientais adversas (BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. 2007; CANDELA, T.; FOUET, A.; 2006). Já em Bacillus anthracis o PGA capsular é o principal mecanismo de patogenicidade da bactéria, sendo um mediador da evasão imune (JANG et al., 2011). As vacinas desenvolvidas para a prevenção de infecções causadas por Bacillus anthracis, constituídas de PGA conjugado com proteínas, induzem níveis elevados de anticorpos anti-PGA demonstrando a importância deste constituinte na patogenicidade desta bactéria. Esta proteção também é observada em modelos animais, onde foi demonstrado que a vacina conjugada além de induzir a produção de anticorpos anti-PGA, promove uma resposta imune protetora dependente de células T (SCHNEERSON et al., 2003). Outros efeitos biológicos também podem ser atribuídos ao PGA. KIM et al. (2007) observaram que a administração oral de elevada massa de PGA molecular em animais, produzido a partir de Bacillus subtilis, induziu imunidade antitumoral mediada por células NK, reduzindo significativamente o tamanho dos tumores nos animais tratados. O γ -PGA é um biopolímero aniônico onde os aminoácidos são ligados por ligações peptídicas do tipo γ -amino, diferentemente das proteínas onde esta ligação é α -amino, fazendo com que este polímero seja resistente à ação das proteases (CANDELA, T.; FOUET, A. 2006). KOCIANOVA et al. (2005) estudaram a importância do γ -PGA no S. epidermidis em cateteres implantados em animais, demonstrando que esta substância é um componente-chave da proteção da bactéria à resposta imune inata, como peptídeos antimicrobianos e neutrófilos, sendo indispensável para a persistência da infecção relacionada com dispositivos médicos. Além disso, o γ -PGA também protege o S. epidermidis de altas concentrações de sal, uma das principais características do seu ambiente natural, a pele humana.

OBJETIVO

- Caracterizar por técnica molecular a presença do gene capB.
- Adaptar a metodologia de purificação, extração, purificação e quantificação do PGA em amostras de Staphylococcus epidermidis.

METODOLOGIA

Foram estudadas 51 amostras clínicas de Staphylococcus epidermidis isoladas a partir de sangue analisado em hemoculturas (47) e de culturas quantitativamente significativas de ponta de cateter (4) de pacientes internados no Hospital dos Servidores do Estado (HSE). As amostras de S. epidermidis foram submetidas à técnica de PCR simples para detecção dos genes potencialmente envolvidos na aderência e formação de biofilme e produção de ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados foram os correspondentes ao gene capB (KOCIANOVA et al., 2005). As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 25 μ L contendo Red Mix®, água ultra purificada, primer F e R nas concentrações finais de 0,4 μ M e 1 μ L do DNA total da amostra previamente extraído (SOUZA et al., 2012). As condições de amplificação das misturas de reação para detecção dos genes capB foi desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1:30 minuto. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X a 100 volts, sendo colocado em cada poço de gel 4 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão de carregamento e 2 μ L de GelRed. No gel

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

de agarose, foi utilizado um marcador de tamanho de DNA (100 bp plus DNA ladder). As imagens foram fotografadas sob luz ultravioleta e o tamanho dos produtos amplificados estimados por comparação com o marcador de DNA (SOUZA et al., 2012). Foram utilizadas como controles as amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 (controle positivo) e ATCC 12228 (controle negativo). Os métodos de extração descrito por KOCIANOVA et al. (2005) e o de purificação-quantificação de PGA de KANNO et al. (1995) foram utilizados com adaptações. A extração de PGA a partir da cultura de 24 horas à 35°C da amostra foi realizada como preconizado por KOCIANOVA et al. (2005) que emprega a autoclavação a 115°C por 45 minutos, utilizando-se HCl ao invés do ácido tricloroacético descrito pelo autor. Na purificação e quantificação do ácido γ -poliglutâmico foi utilizada uma metodologia baseada na descrita por KANNO et al. (1995), com miniaturização de todo o processo, ou seja, empregando-se volumes reduzidos em todas as etapas da reação. As culturas autoclavadas de cada amostra foram centrifugadas a 25000 xg por 25 min a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão do tubo, sendo então a massa de células ressolubilizada com 3 mL de água purificada. A suspensão de células foi adicionada de um volume de 0,5mL de HCl concentrado e de 6 mL de álcool etílico, sendo homogeneizada rapidamente por agitação em vortex. Um volume de 5 mL foi transferido para um novo tubo sendo então adicionado progressivamente de solução 1,0 M de NaOH até atingir um pH entre 8,0-9,0. A suspensão foi centrifugada a 25000 xg por 30 min a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão do tubo. O precipitado foi ressolubilizado com 1 mL de tampão fosfato pH 7,0 e 15 mL de etanol absoluto gelado, adicionado lentamente. A mistura foi centrifugada, a 25000 xg por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o precipitado ressolubilizado com 3 mL de tampão fosfato pH 7,0. Um volume de 3 mL deste extrato foi misturado em um novo tubo com 1 mL de uma solução 0,1 M de brometo de cetiltrimetilamônio (CET) / 1M de NaCl. A mistura foi agitada e deixada em repouso a 30°C por 20 min sendo ao final da incubação a sua absorbância (ABS400nm) determinada espectrofotometricamente a 400 nm. O valor da absorbância foi considerado presuntivamente como a quantidade de PGA obtida a partir das células da amostra.

RESULTADOS

Inicialmente, duas amostras capB positivas foram submetidas à extração, purificação e quantificação de PGA utilizando-se os métodos propostos pelos autores e os com as adaptações propostas em nosso estudo. Os resultados obtidos foram similares em ambas as metodologias (dados não mostrados) e a partir daí passamos a usar os métodos adaptados. Baseado na dispersão dos resultados obtidos na quantificação do PGA foi proposta uma classificação das amostras estudadas em: não-produtora - quando não houve ABS400nm; produtora fraca- quando a ABS400nm foi de 0,001 até 0,400; moderada; ABS400nm de 0,401 a 1,000 e forte para ABS400nm maior que 1,000. Segundo esse critério, as 41 (80%) amostras capB positivas foram classificadas em: 16 (39%) não-produtoras, 11 (27%) produtoras fracas, 11 (27%) produtoras moderadas, 3 (7%) amostras produtoras fortes. Neste estudo ficou evidenciado que a maioria (80%) dos isolados clínicos de *S. epidermidis* analisados possui o gene capB e que a produção de PGA, em diferentes níveis, foi detectada em 62% destes isolados capB positivos. Em todas as 10 (20%) amostras capB negativas não foi detectada produção de PGA. A correlação da produção de biofilme, um dos marcadores de virulência mais estudados em *S. epidermidis* (FEY; OLSON, 2010), e a de PGA foi observada em 25 (60%) amostras, enquanto que 9 (94%) amostras não produtoras de PGA também não produziram biofilme. Apesar da correlação observada entre a produção de PGA e biofilme, não existem evidências na literatura de que a produção de PGA influencie na formação de biofilme. Todavia, esta associação pode estar relacionada com a proteção conferida pelo biofilme. Neste estudo, a detecção da produção de diferentes níveis de PGA nas amostras capB positivas, assim como a ausência de produção em um percentual considerável (39%) de amostras capB positivas evidencia diferentes níveis de expressão do operon onde o gene capB está inserido.

CONCLUSÃO

A presença do gene capB foi detectada na maioria das amostras clínicas de *S. epidermidis* estudadas, frequentemente em associação com a produção de biofilme, fator sabidamente associado à virulência nesta espécie. Tal associação é importante na medida em que o PGA, polímero codificado pelo operon cap, parece desempenhar um papel fundamental seja na sobrevivência do *S. epidermidis* quando da colonização da pele, seja no desenvolvimento e/ou persistência de processos infecciosos em dispositivos médicos. As adaptações feitas nas metodologias de extração, purificação e quantificação do PGA mostraram-se satisfatórias, promovendo sua simplificação e redução dos custos de reagentes, de modo a possibilitar sua aplicação no estudo de um número elevado de amostras. Além disso, foi observada boa correlação entre os resultados destes testes fenotípicos e a presença ou não do gene capB, especialmente em amostras nas quais este elemento genético está ausente.

REFERÊNCIAS

- BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. 2007 Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Applications in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries.
- CANDELA, T; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 60, n. 5, p. 1091-1098, 2006.
- FEY, P. D.; OLSON, M.E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* v. 5, p. 917–933, 2010.
- JANG, J.; CHO, M.; CHUN, JH.; CHO, MH.; PARK, J.; OH, HB.; YOO, CK.; RHIE, GE.; The poly- γ -D-glutamic acid capsule of *Bacillus anthracis* enhances lethal toxin activity.
- KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, v.42, p.878–886, 1995.
- KIM, TW.; LEE, TY.; BAE, HC.; HAHM, HJ.; KIM, YH.; PARK, C.; KANG, TH.; KIM, CJ.; SUNG, MH.; POO, H. Oral administration of high molecular mass poly-gamma-glutamate induces NK cell-mediated antitumor immunity.



13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

KOCIANOVA, S. et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.3, p.688-694, 2005.

SCHNEERSON, et al. Poly(gamma-D-glutamic acid) protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*: a potential addition to the anthrax vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:8945–8950.

SOUZA, I. S., SILVA, A. A. L., SARAMAGO, C.S.M., BENTO, C. A. M., HOFER, E., SILVA, M. A. P., SOUZA, M. J., SILVA FILHO, R. G., DIAS, R. C. S. Mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* In: 11a. Jornada de Iniciação Científica UNIRIO, 2012, Rio de Janeiro. CD-ROM Semana de Integração Acadêmica 2012. , 2012.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRANZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 28S, S14–S20, 2006.



Livro de Resumos
ISSN 2236-0522

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA