

HEMOLISINAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE

IVE FRANCESA TROCCOLI HEPPEL¹; TONY PICOLI²; CRISTINA MENDES PETER², NATHÁLIA DE SOUZA MEYER¹; BRUNA DA SILVA URRUTIA¹; JOÃO LUÍZ ZANI³

¹ Graduanda do curso de Medicina Veterinária, UFPel – ivehepper@yahoo.com.br; anatisouza@hotmail.com; brunaurrutia@hotmail.com

² Programa de Pós Graduação em Veterinária, UFPel – picolivet@gmail.com; cristina_peter@hotmail.com

³ Professor Adjunto do Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel – jluizzani@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é reconhecido mundialmente como o principal causador de infecções intra-mamárias em vacas lactantes e, por esse motivo causador de grandes prejuízos econômicos ao produtor e à indústria de lácteos (GODDEN et al. 2002). BRITO & BRITO (1998) estimaram que um único quarto mamário infectado por essa bactéria poderá ter a produção de leite reduzida em até 45%. A referida espécie é uma bactéria simbiote do homem e animais que, em grandes quantidades torna-se virulenta. É um coco Gram positivo, que se apresenta com arranjos em forma de “cacho de uva”, catalase positivo, coagulase positivo, oxidase positivo, fermentador do manitol, maltose e trealose e ainda positivo para a produção de acetoina (QUINN, 2005).

A importância clínica de *S. aureus* está relacionada à uma variedade de fatores de virulência como a proteína A que desempenha papel antifagocitário (ALONSO; DAGGET 2000), a enzima coagulase, responsável pela transformação do fibrinogênio em fibrina (PALMA et al. 1999) e as toxinas citolíticas, dentre as quais destacam-se as hemolisinas alfa, beta e delta, que estão associadas às alterações patológicas observadas durante o curso de infecções estafilocócicas, tais como a formação de abscessos, lesões hemorrágicas e necróticas (BURNSIDE et al., 2010).

A hemolisina alfa é considerada por alguns autores como um dos principais fatores de patogenicidade dessa bactéria em função dos seus efeitos hemolíticos, dermonecroticos e neurotóxicos (DINGES et al., 2000). É secretada pelo *S. aureus* como monômeros solúveis em água que são integrados à membrana de diversos tipos de células e são capazes de formar poros de tamanhos variados determinando lise osmótica, formação de vacúolos e defeitos em enzimas mitocondriais, interferindo com a produção de ATP (SURIYAPHOL et al., 2009). A hemolisina beta embora não cause lise celular, causa instabilidade na membrana plasmática, tornando a célula alvo suscetível à vários fatores como mudança de pH e temperatura (SABINI et al., 2001). Seu mecanismo de ação está relacionado com a degradação da esfingomielina presente na membrana fosfolipídica (COELHO et al., 2009). A hemolisina delta

é um pequeno peptídeo capaz de causar lise em uma variedade de células de mamíferos, além de eritrócitos e, o papel desta hemolisina na patogênese das infecções estafilocócicas ainda não está claramente estabelecido (BURNSIDE et al., 2010).

CHIH-WEI et al. (2011), define a produção de hemolisinas como determinante para a patogenicidade de micro-organismos, já que ao degradar tecidos, permitem a invasão e disseminação. O objetivo deste trabalho foi detectar a produção das hemolisinas de *S. aureus* isolados de leite proveniente de tanques refrigeradores.

2. METODOLOGIA

A partir de amostras de leite coletadas diretamente de tanques refrigeradores em propriedades leiteiras localizadas na região sul do Rio Grande do Sul, foram isolados e identificados várias cepas de *S. aureus* que compõe a bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Vinte dessas cepas foram utilizados para a determinação da produção de hemolisinas.

Para tanto, os cultivos armazenados em caldo enriquecedor BHI (Brain-Heart Infusion acrescido de glicerina) à temperatura inferior a -10°C foram semeados em meio de cultivo Agar-sangue contendo 5% de sangue ovino desfibrinado, incubados à 37°C em estufa bacteriológica sob condições de aerobiose e, após crescimento das colônias e visualização dos halos hemolíticos, essas bactérias foram colocadas em suspensão em solução salina estéril a 0,85% sob turbidez ajustada à escala 01 de Mc Farland (3×10^8 bactérias/mL).

Previamente, foi coletado assepticamente sangue de carneiro, que foi desfibrinado através de agitação suave com pérolas de vidro. No laboratório o sangue foi centrifugado, o sobrenadante descartado e após realizado duas lavagens com tampão PBS, pH 7,2. O último procedimento foi ressuspender as hemácias em PBS no volume inicial de sangue e realizar uma diluição decimal com o mesmo diluente.

Em placas de polietileno com 96 cavidades, foram depositados 100 μL de hemácias diluídas, 50 μL de caldo BHI e 50 μL das suspensões bacterianas. Cada cepa foi testada em quadruplicata, utilizando hemácias e BHI como controle negativo. A placa foi incubada a 37°C durante 48 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos com micropipeta ajustada em 100 μL e transferidos para uma nova placa nas mesmas posições. Foi realizada leitura em espectrofotômetro para microplacas, avaliando a absorbância de luz sob comprimento de onda de 492 nm. Foram consideradas positivas as cepas cujas médias de absorbância ultrapassaram a média dos controles negativos acrescidos de dois desvios padrões. A análise estatística foi realizada através da comparação entre médias pelo teste *t* de Student, utilizando o software estatístico BioEstat versão 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 cepas de *S. aureus* testadas, 18 foram consideradas positivas, ou seja, as médias da absorvância foram superiores à média dos controles negativos somados de dois desvios padrões. A média da absorvância das cepas positivas foi de $0,652 \pm 0,124$ e a média dos controles negativos foi de $0,342 \pm 0,055$. Apenas duas cepas foram consideradas negativas com média $0,212 \pm 0,04$.

O sobrenadante recolhido e transferido à segunda placa tornou-se translúcido sempre que as cepas foram consideradas negativas, o que correspondeu com os controles negativos. Esse fato pode ser explicado pela sedimentação das hemácias, as quais não foram transferidas para a segunda placa. Já o sobrenadante das cepas consideradas positivas tornou-se avermelhado, em diferentes intensidades. Isso é explicado pelo rompimento das hemácias pelas exoenzimas citolíticas (hemolisinas) liberadas por *S. aureus* com conseqüente extravazamento de hemoglobina para o sobrenadante, o qual tornou-se avermelhado e pôde ser diferenciado das cepas não produtoras de hemolisinas e dos controles positivos, não apenas visualmente, mas também na espectrofotometria.

Houve diferença estatística entre a média de absorvância dos controles negativos e as médias de absorvância das cepas positivas ($p < 0,001$) e entre as cepas negativas e as cepas positivas ($p < 0,001$). Assim, nota-se que *S. aureus* têm grande capacidade de produção de hemolisinas, as quais lesam não apenas hemácias mas são responsáveis por um grande número de lesões observadas em diversas enfermidades causadas por este agente.

Não houve diferença entre o controle negativo e as cepas negativas. Neste trabalho não se quantificou o número de hemácias que sofreram lise em contato com *S. aureus* produtores de hemolisinas, porém os resultados sugerem que quanto maior a absorvância (mais hemácias rompidas), e portanto mais produtora de hemolisinas é a cepa.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que as cepas de *S. aureus* isoladas de leite são produtoras de hemolisinas, e que o grau de hemólise observada está vinculado à produção de enzimas citolíticas liberadas pelo patógeno..

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, D.O.V.; DAGGETT, V. Staphylococcal Protein A: Unfolding pathways, unfolded states, and differences between the B and E domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.97, p.133-138, 2000.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente**. EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora. 25p, 1998.

BURNSIDE, K.; LMEBO, A.; REYES, M. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **Public Library of Science**, v.5, p.1-16, 2010.

CHIH-WEI, L.; YIU-KAY, L.; YU-TSUENG, L. *Staphylococcus aureus* Hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β - hemolysin and camp factor. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.131, p.401-409, 2011.

COELHO; S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA I.A. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p.369-374, 2009.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Review**, v.13, p.16-34, 2000.

GODDEN, S.M.; JANSEN, J.T.; LESLIE, K.E.; SMART, N.L.; KELTON, D.F. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Canadian Veterinary Journal**. v.43, p.38-42, 2002.

PALMA, M.; HAGGAR, A.; FLOCK, J. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.9, p.2840-2845, 1999.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1 Ed. Artmed, 2005.

SABINI, L.; TORRES, C.; DEMO, M. Effect of *Staphylococcus* toxins isolated from dairy cow milk on vero cell monolayers. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.43, p.13-18, 2001.

SURIYAPHOL, G.; SARIKAPUTI, M.; SURİYAPHOL P. Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus* α -toxin. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.32, p.491-502, 2009.