

## Genes de virulência para mastite em isolados de Bactérias do Ácido Lático obtidas do leite oriundas das fazendas produtoras do Queijo Artesanal Canastra

Pedro William Maia<sup>1</sup>; Marcio Vinicius Medeiros de Carvalho<sup>1</sup>; Nathan Felipe Morais de Sousa<sup>2</sup>; Talita Gomes da Costa<sup>3</sup>; Gustavo Augusto Lacorte<sup>4</sup>; Raphael Steinberg da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudantes de graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Minas Gerais - campus Bambuí

<sup>2</sup>Mestrando em microbiologia agrícola Universidade Federal de Lavras - UFLA

<sup>3</sup>Doutorado Direto no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental na faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP

<sup>4</sup> Professores e Pesquisadores do Instituto Federal de Minas Gerais - campus Bambuí

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi fazer o levantamento da presença de genes codificadores para fatores de virulência para mastite em 122 isolados pertencentes a 34 espécies diferentes de Bactérias do Ácido Lático (BAL) isoladas de leite cru obtido de vacas individuais e de tanque de expansão refrigerado em 5 fazendas produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra, utilizando a técnica de PCR, seguida de resolução dos produtos em eletroforese em gel de agarose corado com Brometo de etídeo. Em doze isolados foi encontrada a presença do gene codificador do fator de virulência *gelE* e, em seis deles simultaneamente a presença dos genes codificadores dos fatores devirulência *efa* e *cad*. Porém, a grande maioria dos isolados, isto é 110 deles não apresentaram nenhum dos três fatores de virulência aqui avaliados, apresentando potencial uso seguro em bovinos de leite. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para selecionar e caracterizar novas linhagens de BAL com potencial probiótico para o controle da mastite.

**Palavras-chave:** Bactérias do Ácido Lático 1.; Probióticos 2.; Mastite 3.; Fatores de Virulência 4.

### INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo de micro-organismos que podem estar presentes em diversos ambientes ricos em nutrientes, representadas por cerca de 530 espécies e subespécies. Apresentam-se com morfologia de cocos ou bastonetes, gram positivas, catalase negativas, não esporuladas e geralmente sem motilidade.

A abordagem preventiva e terapêutica mais usada até hoje, em programas de controle de mastite bovina, é a administração de antibióticos, principalmente pela via intramamária. Entretanto, a eficácia dessa abordagem ainda é baixa, principalmente no tratamento ou prevenção de mastite causada por *S. aureus*.

Nos anos de 2020 e 2021, foram isolados e identificados 122 linhagens pertencentes a 34 espécies diferentes de BAL a partir de amostras de leite individual e de tanque de expansão refrigerado em 5 fazendas produtoras do Queijo Minas Artesanal Canastra (QMAC). Este

trabalho apresenta um dos diferentes testes de caracterização probiótica *in vitro*, que determina a capacidade de uma linhagem bacteriana ser potencialmente probiótica e segura para uso em animais ou seres humanos. Essa bateria de testes inclui avaliação da hidrofobicidade celular, avaliação da produção de exopolissacarídeos, de produção de biofilme, antibiograma e antagonismo contra patógenos causadores de mastite, dentre outros. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença e distribuição dos genes *gelE*, *efa* e *cad* codificadores de fatores de virulência para mastite, em amostras de DNA genômico total extraído dos em 122 isolados pertencentes a 34 espécies diferentes de BAL obtidos de amostras de leite oriundos de fazendas produtoras do QMAC.

### **METODOLOGIA OU MATERIAL E MÉTODO**

O leite foi coletado individualmente por ordenha manual e armazenado em dois tubos estéreis de 50mL, um com azidiol e outro com bronopol para Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), respectivamente, e um tubo de polipropileno estéril de 15mL para o isolamento de BALs. Com o objetivo de reduzir a contaminação das amostras com a microbiota externa, a higienização dos tetos foi realizada antes de cada coleta com uma solução de Etanol 70%, em seguida, os quartos mamários foram secados com papel toalha individual autoclavado. As amostras foram coletadas apenas no quarto dianteiro direito em todos os animais. Os primeiros jatos de leite foram descartados. As amostras de leite recém-colhidas foram armazenadas em caixa térmica a 4°C e em seguida transportadas para o Laboratório de Pesquisa Multiusuário (LaPeM) do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí (IFMG – Campus Bambuí) para processamento.

A enumeração e o isolamento bacteriano foram feitos a partir de amostras de leite cru plaqueadas pelo método de *pour plate* em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia, Baltimore, MD, EUA) não diluídas e com respectivas diluições seriadas (CHEN et al., 2008), seguidas de incubação em estufa microbiológica (MyLabor, São Paulo, Brasil) em aerobiose durante 24-48h, a 37°C. Os plaqueamentos foram feitos em duplicatas.

Em média, 10% das colônias de cada placa, com diferentes morfotipos, foram selecionadas e isoladas a partir de estria simples (CHEN et al., 2008). Os isolados foram submetidos aos testes fenotípicos de coloração de Gram e teste de produção de catalase (HARRIGAN & MACCANCE, 1976; SHARPE, 1976; COLLINS & LYNE, 1980).

Os isolados que apresentaram morfologia de bastonetes, cocos ou cocobacilos, gram-positivos e catalase-negativos, foram selecionados como presuntivos BAL e purificados a partir de estria de esgotamento. A pureza foi avaliada e confirmada microscopicamente, em seguida, os isolados foram crescidos em caldo MRS por 24-48h, a 37°C em aerobiose, em seguida acrescidos de glicerol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 20% v/v. Seguindo esses procedimentos foram obtidos 122 isolados geneticamente distintos pertencentes a 34 espécies diferentes de BAL identificadas por PCR-ARDRA ou sequenciamento.

Após a reativação e crescimento dos isolados purificados, as linhagens presuntivas de BAL

foram individualmente submetidas ao processo de extração de DNA genômico com base no protocolo de fenol:clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Após a extração de DNA genômico, o material genético foi quantificado e sua pureza avaliada em Nanodrop (ThermoFischer, Massachusetts, EUA).

A detecção da presença dos genes *gelE*, *efa* e *cad* que codificam fatores de virulência comuns em bactérias causadoras de mastite foi avaliada nos 122 isolados de BAL por PCR. Para isso, o 100 ng do DNA total dos isolados foram amplificados utilizando nas reações PCR Master Mix (Cellco) e 1 µM dos pares de iniciadores para cada um dos genes avaliados. Os iniciadores e o tamanho de *amplicon* esperado para cada um dos genes estão sumarizados na TABELA 1. Foram utilizadas condições de ciclagem descritas por Espeche e col. (2012) com adaptações. Os *amplicons* foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados em transluminador de UV, após coloração com brometo de etídeo. Em todas as reações foi usado como controle positivo amostra de *Enterococcus faecalis* GIRO33L2\*, que teve seus *amplicons* previamente confirmados por sequenciamento atestando a presença dos genes.

TABELA 1 - Descrição das características dos iniciadores utilizados para avaliação da presença de fatores de virulência relacionados à mastite em BAL

Genes	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tm	Tamanho do <i>amplicon</i>
<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT	59	419 pb
	R: ACGCATTGCTTTTCCATC		
<i>efa</i>	F: GCCAATTGGGACAGACCCTC	59	688 pb
	R: CGCCTTCTGTTTCTTCTTTGGC		
<i>cad</i>	F: CGTAGCATCTTCAGAAACG	51	502 pb
	R: TGAGAATGTTGTGTGGTAGC		

Legenda: Tm – Temperatura de *melting* ou temperatura de anelamento. pb- pares de base  
F: *foward* e R: *reverse*

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 122 isolados de BAL avaliados, 110 deles (90,2%) não apresentaram nenhum dos genes aqui avaliados. Doze isolados (*E. faecalis* IFMGV31107; *E. faecalis* IFMGV31131; *E. faecalis* IFMGV102131; *E. faecalis* IFMGT84114; *E. faecalis* IFMGT84123; *E. faecalis* IFMGT109104; *Streptococcus dysgalactiae* IFMGV31115; *Streptococcus lutetiensis* IFMGV92106; *S. Lutetiensis* IFMGV92111; *Enterococcus casseliflavus/galinarum* IFMGV102124; *Enterococcus hirae* ,IFMGV102129 e *Aerococcus viridans/urinaeequi* IFMGV122107) apresentara amplificação do gene *gelE*. Em seis BAL (*E. faecalis* IFMGV31107; *E. faecalis* IFMGV31131; *E. Faecalis* IFMGV102131; *E. faecalis* IFMGT84114; *E. faecalis* IFMGT84123; *E. faecalis* IFMGT109104) foi detectada à presença do gene *efa* e *cad* simultaneamente. Entre os 12 isolados que mostraram a presença de pelo menos um gene codificador de fator de virulência, 6 deles

apresentaram simultaneamente os três genes codificadores de fatores de virulência, sendo eles *E. faecalis* IFMGV31107; *E. faecalis* IFMGV31131; *E. faecalis* IFMGV102131; *E. faecalis* IFMGT84114; *E. faecalis* IFMGT84123; *E. faecalis* IFMGT109104.

Dos 12 isolados positivos para pelo menos um dos genes codificadores de fatores de virulência, seis deles foram isolados de leite de animais saudáveis com CCC < 200.00 cel./mL (*E. faecalis* IFMGV102131; *S. lutetiensis* IFMGV92106; *S. lutetiensis* IFMGV92111; *E. casseliflavus/galinarum* IFMGV102124; *E. hirae* IFMGV102129 e *A. viridans/urinaeequi* IFMGV122107), três foram isolados de leite de animais com mastite subclínica com CCS > 200.00 cel./mL (*E. faecalis* IFMGV31107; *E. faecalis* IFMGV31131; *S. dysgalactiae* IFMGV31115) e três deles foram isolados de amostras de tanque de expansão refrigerado (*E. faecalis* IFMGT84114; *E. faecalis* IFMGT84123; *E. faecalis* IFMGT109104). Portanto, aparentemente não existe correlação entre a origem dos isolados e a presença ou não de genes codificadores de fatores de virulência. Os dados referentes aos 12 isolados positivos para os genes codificadores dos fatores de virulência *gelE*, *efa* e *cad* estão resumidos na TABELA 2.

TABELA 2 – Presença de genes codificadores de fatores de virulência em BAL

Identificação do isolado	Origem do isolado	<i>gelE</i>	<i>efa</i>	<i>cad</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGV31107	IFMG-CAMPUS BAMBUI	+	+	+
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> IFMGV31115	IFMG-CAMPUS BAMBUI	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGV31131	IFMG-CAMPUS BAMBUI	+	+	+
<i>Streptococcus lutetiensis</i> IFMGV92106	ESTRELA DA BOA VISTA	+	-	-
<i>Streptococcus lutetiensis</i> IFMGV92111	ESTRELA DA BOA VISTA	+	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus/galinarum</i> IFMGV102124	ESTRELA DA BOA VISTA	+	-	-
<i>Enterococcus hirae</i> IFMGV102129	ESTRELA DA BOA VISTA	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGV102131	ESTRELA DA BOA VISTA	+	+	+
<i>Aerococcus viridans/urinaeequi</i> IFMGV122107	SÃO ROQUE DE MINAS	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGT84114	SÍTIO BELA VISTA	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGT84123	SÍTIO BELA VISTA	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> IFMGT109104	ESTRELA DA BOA VISTA	+	+	+

**Legenda:** A detecção da presença, nos 122 isolados de BAL, dos genes *gelE*, *efa* e *cad*, que codificam fatores de virulência comuns em bactérias causadoras de mastite, foi determinada por PCR, seguida da resolução e visualização dos *amplicons* produzidos em gel de eletroforese corado com brometo de etídio de acordo com metodologia descrita por Espeche e col. (2012):

+ : presença de amplificação do gene e - : ausência de amplificação do gene.

Fatores de virulência são definidos como moléculas que aumentam a habilidade de um patógeno em causar uma doença, entretanto a presença de fatores de virulência não significa necessariamente que uma linhagem seja virulenta (FUQUAY et al., 2011).

Porém, a avaliação da segurança de uma linhagem bacteriana com potencial probiótico privilegia que bactérias utilizadas para este fim não apresentem genes codificadores para fatores de virulência (GAGGI A et al., 2010). Com base nos resultados encontrados, metade dos isolados que apresentaram genes codificadores de fatores de virulência foram positivos para os três genes aqui avaliados (*gelE*, *efa* e *cad*), sendo todos eles da espécie *E. faecalis*. Esse achado reforça dados da literatura que afirmam que linhagens do gênero *Enterococcus* devem ter seu uso como

probiótico avaliado com muita cautela, e são geralmente não indicadas para este fim (STEINBERG et al., 2022)

## CONCLUSÃO

Mais de 90% dos 122 isolados geneticamente distintos pertencentes a 34 espécies diferentes de BAL originados de amostras de leite de fazendas produtoras do QMAC apresentaram resultados negativos para a avaliação da presença de genes *gelE*, *efa* e *cad* codificadores de fatores de virulência, assim atendendo aos critérios para seu possível uso como probiótico.

## AGRADECIMENTO

Agradecimento à PRRPG-IFMG pelo fomento oferecidos nos editais de Pesquisa Aplicada 065/18 e 087/19 que custearam os experimentos aqui relatados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, H.; WANG, S.; CHEN, M. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol* v. 25, p. 492–501, 2008.

HARRIGAN, W. F.; MACCANCE, M.E.C. *Laboratory Methods in Microbiology*. London and New York: Academic Press, 1976

Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ESPECHE, M. C.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; LARRIESTRA, A.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M. E. F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. v. 18, p. 103 -109, 2012.

FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2ed. Academic Press : Oxford, UK, 2011

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol*, v. 141, p. S15– S28, 2010

CLEWELL, D. B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 415–420, 1991.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli *J. Appl. Bact.*, v. 23 (1), p. 130-135, 1960. 1945.

STEINBERG, Raphael S. et al. Prospecting of potentially probiotic lactic acid bacteria from bovine mammary ecosystem: Imminent partners from bacteriotherapy against bovine mastitis. *International Microbiology*, p. 1-18, 2022.