

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE ACADÊMICOS E PACIENTES DE UMA CLÍNICA ODONTOLÓGICA EM MARINGÁ-PR

Monica de Souza Ferreira de Mattos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Pedro Marquetti Pereira, Regivaldo Florentino Rodrigues, Aline Natália de Santi, Paulo Victor Batista Marini, Sheila Alexandra Belini Nishiyama, Maria Cristina Bronharo Tognim (Orientador), e-mail: mcbtognim@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea: Microbiologia/ Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Tipagem molecular, *cluster*

Resumo:

Staphylococcus aureus é um microrganismo frequentemente encontrado como parte da microbiota da pele e da mucosa nasal, porém este também tem sido descrito como parte da microbiota bucal tanto de indivíduos saudáveis, como também relacionado a infecções. O objetivo do estudo foi analisar a similaridade genética de isolados de *S. aureus* pacientes e acadêmicos de Odontologia utilizando-se a técnica rep-PCR-RW3A e o software Bionumerics®. A tipagem molecular foi realizada pela técnica rep-PCR-RW3A (*Repetitive Extragenic Palindromic* em Reação da Cadeia da Polimerase) em 61 isolados de *S. aureus* de 75 pacientes e 75 acadêmicos, provenientes das cavidades nasal e bucal dos indivíduos. A análise do perfil padrão de bandas dos isolados foi realizada usando o software Bionumerics® (versão 6.5). Os isolados com coeficiente de Dice $\geq 0,80$ foram considerados pertencentes ao mesmo *cluster*. Entre os isolados de *S. aureus* identificados, foi observada uma grande variabilidade genética (44 *clusters* distintos). Em 12 diferentes *clusters* havia ao menos dois isolados com similaridade superior a 80%, dos quais três possuíam representantes tanto de pacientes quanto acadêmicos, quatro apenas de pacientes e cinco exclusivamente de acadêmicos. A relação epidemiológica entre os indivíduos não foi determinada. A presença dos mesmos *clusters* entre pacientes e acadêmicos da Clínica Odontológica sugere uma possível disseminação de *S. aureus* durante o atendimento odontológico. A alta variabilidade genética verificada entre os isolados demonstram a versatilidade e capacidade de adaptação desse microrganismo em diferentes ambientes, facilitando sua disseminação na comunidade.

Introdução

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo colonizador da microbiota da pele e da mucosa nasal, sendo este seu principal reservatório (Alkharsah et al., 2018). Entretanto, esse microrganismo já tem sido reportado na cavidade bucal como parte

da microbiota e até como um agente patogênico de infecções bucais (Kityamuwesi et al., 2015).

Determinar a relação epidemiológica entre os isolados de *S. aureus* é útil para a compreensão do modo de disseminação desse importante microrganismo. Nos últimos anos *S. aureus* resistente à oxacilina (*oxacillin resistant Staphylococcus aureus* - ORSA) na comunidade tem sido cada vez mais frequente, dificultando o controle e o tratamento de possíveis infecções causadas por esse patógeno (Alkharsah et al., 2018).

Existem vários métodos genotípicos e fenotípicos empregados para estabelecer o perfil epidemiológico dos isolados. A técnica de *Repetitive Extragenic Palindromic* em Reação da Cadeia da Polimerase (REP-PCR) é uma técnica molecular, na qual consiste no uso de *primers* sintetizados a partir de sequências repetidas de DNA, como a sequência definida pelo *primer* RW3A que gera impressões digitais (*fingerprints*) do DNA, permitindo, desse modo, a diferenciação das bactérias isoladas em diferentes *cluster* (Chapaval et al., 2006). Assim, o objetivo do estudo foi analisar a similaridade genética de isolados de *S. aureus* de pacientes e acadêmicos de Odontologia utilizando-se a técnica rep-PCR-RW3A e o software Bionumerics®.

Material e métodos

Isolados bacterianos

O Laboratório de Microbiologia Médica – UEM realiza a vigilância de microrganismos resistentes tanto no hospital quanto na comunidade e para tanto possui isolados recuperados de amostras clínicas de pacientes e de indivíduos da comunidade. Durante o ano de 2017 foram rastreados 150 indivíduos, sendo de 75 acadêmicos do último ano do Curso de Odontologia do Centro Universitário Uningá, bem como de 75 pacientes atendidos por esses acadêmicos na Clínica Odontológica da mesma instituição. Destes indivíduos, foram recuperados 61 isolados de *S. aureus* e enviados ao laboratório e mantidos em freezer -20°C, sendo os mesmos incluídos nesse estudo.

Tipagem molecular

Para realização das técnicas moleculares, os isolados foram reativados em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* - TSA (Difco, Sparks, Maryland, EUA) por 24-48h à 37°C para confirmação da pureza.

A extração do DNA bacteriano foi realizado com CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide). As amostras extraídas foram mantidas em freezer a -20°C. Em seguida, a caracterização molecular para análise de similaridade foi realizada pelo método rep-PCR-RW3A, utilizando-se o *primer* 5' TCGCTCAAACAACGACACC 3' de acordo com Del Vecchio e colaboradores (1995). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese de DNA em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e a interpretação de bandas geradas foi feita no *software* Bionumerics®, versão 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Este é um *software* que analisa similaridade através da comparação de padrões de bandas produzidos por PCR para regiões repetitivas

palindrômicas. Um dendograma foi criado e os isolados que apresentaram similaridade (coeficiente de DICE $\geq 0,80$) foram considerados pertencentes ao mesmo *cluster*.

Resultados e Discussão

A análise do perfil de bandas dos 61 isolados de *S. aureus* obtidos pela metodologia rep-PCR-RW3A resultou em 44 *clusters* distintos, demonstrando uma grande variabilidade genética entre os isolados comunitários. Desses, foram destacados 12 *clusters* que apresentaram pelo menos dois isolados com similaridade superior a 80%, distribuídos em três diferentes grupos: um primeiro grupo (4 *clusters*) constituído exclusivamente de isolados de pacientes, um segundo grupo (5 *clusters*) constituído exclusivamente de isolados de acadêmicos e um terceiro grupo (3 *clusters*) no qual os isolados de *S. aureus* possuíam alta similaridade genética e que foram recuperados de acadêmicos e pacientes por eles atendidos (tabela 1). No presente estudo, não foi determinada a relação epidemiológica entre os indivíduos, entretanto a observação de que isolados dos acadêmicos possuíam características genéticas similares àsquelas dos seus pacientes poderia sugerir uma possível disseminação de *S. aureus* durante o atendimento odontológico. Considerando a importância desse microrganismo, o fato aqui verificado necessita ser investigado em estudos futuros.

Tabela 1 Distribuição dos *clusters* de *S. aureus* entre acadêmicos e pacientes de uma Clínica Odontológica de uma instituição superior de ensino.

nº de <i>cluster</i>	nº de isolados por <i>cluster</i>	nº de isolados	Distribuição dos <i>clusters</i> em três diferentes grupos*		
			Pacientes	Acadêmicos	Pacientes/Acadêmicos
32	1	32	14	18	-
8	2	16	4	2	2
3	3	9	-	3	-
1	4	4	-	-	1
44	10	61	18	23	3

*três grupos: Pacientes: constituído apenas de isolados de pacientes; Acadêmicos: constituído apenas de apenas isolados de acadêmicos; Paciente/Acadêmico: constituído apenas de isolados de pacientes e acadêmicos.

Conclusões

A presença dos mesmos *clusters* entre pacientes e acadêmicos da Clínica Odontológica sugere uma possível disseminação de *S. aureus* durante o atendimento odontológico. A alta variabilidade genética verificada entre os isolados demonstra a versatilidade e capacidade de adaptação desse microrganismo em diferentes ambientes, facilitando sua disseminação na comunidade.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq por proporcionar a realização desse projeto de iniciação científica e aos autores respectivamente.

Referências

ALKHARSAH, K. R, et al. Comparative and molecular analysis of MRSA isolates from infection sites and carrier colonization sites. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 7, 2018.

CHAPAVAL L, et al. Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 309-320, 2006.

DEL VECCHIO, V. G. J. M., et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive- sequence PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p.21412144. 1995

KITYAMUWESI, R., et al. Characteristics of pyogenic odontogenic infection in patients attending Mulago Hospital, **Uganda: a cross-sectional study. BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 46, 2015.