

ANAIS

**SEMANA TÉCNICO-CIENTÍFICA COMEMORATIVA
DOS 40 ANOS DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

VIII MOSTRA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**UBERLÂNDIA-MG
SETEMBRO/2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ANAIS DA SEMANA TÉCNICO-CIENTÍFICA COMEMORATIVA AOS 40 ANOS
DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

VII MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**UBERLÂNDIA
2011**

PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus* E A ASSOCIAÇÃO COM OS GENES *icaAD* e *clfAB* NO PROCESSO DE FORMAÇÃO.

MELO, P. C^{1*}.; SOUZA, V².; ALMEIDA, C.C¹.; MEDEIROS, M.I.M³.; FERREIRA, L.M⁴.; NADER-FILHO, A¹.

1. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, policame@yahoo.com.br
2. Pesquisadora da Embrapa Caprinos, Sobral-Ce.
3. Pesquisadora ITAL, Campinas-SP
4. Professor da Universidade de Barretos, UNIFEB.

RESUMO: A formação de biofilmes nas doenças crônicas de animais pelos *Staphylococcus aureus* têm aumentado o interesse por pesquisas com a caracterização de genes envolvidos neste processo. Este estudo tem como objetivo determinar a habilidade dos *Staphylococcus aureus* produzirem biofilmes e associar com os genes de adesão *icaAD* e *clfAB*. Foram estudadas 440 estirpes de *S. aureus* oriundas de leite de vacas com mastite subclínica, tanque de expansão e ambiente de ordenha. Para determinar a produção de biofilme foram realizados os testes fenotípicos do Ágar Vermelho Congo e teste de aderência em microplacas. Para identificar os genes envolvidos foi realizada a reação em cadeia da polimerase. Os resultados demonstraram que a grande maioria dos isolados foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*” sendo 79% dos isolados de leite e 89% dos isolados de ambiente de ordenha no Agar Vermelho Congo e 84% para as estirpes oriundas de leite e 85% para as estirpes oriundas de ambiente de ordenha no teste de microplacas, sendo que 90%, 97%, 99% e 98% das estirpes apresentaram os genes *icaA*, *icaD*, *clfB* e *clfA* respectivamente. O envolvimento dos genes com a produção de biofilme principalmente nos equipamentos de ordenhadeira, alerta para um melhor direcionamento nas condutas higiene e sanitização além da terapia e prevenção da mastite em bovinos leiteiros.

Palavras-chave: exopolissacarídeo, análise molecular, adesão bacteriana.

INTRODUÇÃO

A adaptação genética é um dos principais mecanismos de sobrevivência das bactérias permitindo mutações, recombinação entre os genes, aquisição de material genético e regulação da expressão de material genético. A flexibilidade bacteriana na expressão de seus genes permite a sobrevivência em diferentes tipos de meio ambiente e até mesmo uma rápida adaptação a diversas condições que possam existir neste meio ambiente. (JEFERSON, 2004).

Os *S. aureus* são notavelmente conhecidos por possuírem uma abundante quantidade de produção do fator de adesão A e B (*clumping factor* “*clfA* e *clfB*”) e fatores ligantes de fibronectina (FnBA e FnBB) que são proteínas importantes na adesão inicial (PATTI, et al., 1994). A inativação do *clfA* resultou em extrema inibição da adesão dos *S. aureus* a superfícies contendo fibrinogênio “*in vitro*” e “*in vivo*”. Em estudo com humanos

os *S. aureus* mutantes para gene *clfA* e *clfB* produzirem 50% a menos de endocardites (WOLZ et al., 2002).

A glucosamina, base do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) ou poli-n-succinilglucosamina (PNSG) é responsável pela adesão célula-célula. Um mutante de *S. aureus* que não produziu (PIA, PNSG) foi incapaz de formar biofilme, enquanto que, a adesão inicial a célula não foi afetada. O operon *icaABCD* é responsável pela sua síntese (GROSS et al., 2001).

Diante de poucos estudos relacionados com biofilme na mastite bovina, este estudo tem como intuito de estudar as características fenotípicas e genotípicas dos *S. aureus*, tentando associar estes genes com a produção de biofilmes, buscando assim um maior entendimento para o estudo da mastite bovina estafilocócica.

METODOLOGIA

As 440 estirpes de *S. aureus* foram obtidas de uma propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, sendo isoladas microbiologicamente, bioquimicamente e molecularmente 304 estirpes de leite de vacas, 12 de leite tanque de expansão e 124 dos seguintes pontos no ambiente de ordenha: insufladores, mangueiras, mãos-de-ordenhadores, borracha do vácuo e da tampa do tanque de equilíbrio e superfície do tanque de expansão.

Para a análise molecular o DNA genômico foi extraído utilizando Kit de extração (Invitex, Uniscience, Brasil). Após a extração do DNA foram feitas as técnicas de PCR que para os genes *icaAD*, *clfAB* que consistiram em volume de 20µL de reação final contendo em 2.5mM MgCl₂, 200µM de cada nucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25U de Taq polimerase e 100ng de DNA molde. Para os genes *icaAD* foram realizados trinta ciclos de amplificação que consistiram na desnaturação a 92°C por 45 segundos, anelamento a 49°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos em um termociclador, e para os genes *clfAB* foi feita uma incubação a 94° C por 4 minutos; seguida de 30 ciclos 94° C por 1 minuto; 50° C por 1 minuto e meio e 72° C por 1 minuto e meio, e uma extensão final de 10 minutos (CUCARELLA et al, 2001; WOLZ et al. 2002).

A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 1% de gel de agarose corado com Gel red (Uniscience). Foi utilizado um marcador de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil). Foram consideradas positivas as estirpes com tamanho de banda de 1315pb e 381pb para genes *icaA* e *icaD* e 292pb e 205pb para os genes *clfA* e *clfB* respectivamente.

A produção de biofilmes pelas estirpes de *S. aureus* foram determinadas pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA) {0,8g de corante vermelho congo [Sigma] para 1 Lt de Brain Heart Infusion Agar (BHI) [sigma] e 50 gramas de sacarose [sigma]}. (FREEMAN et al, 1989). Para tanto as placas de Ágar Vermelho Congo foram inoculadas e incubadas à 37°C por 24 horas, seguido por uma incubação à temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas e pretas foi utilizada para diferenciar de estirpes não produtoras de biofilmes, as quais apresentaram colônias lisas e vermelhas. Foram também utilizadas as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e (ATCC 12228), para fins de controle positivo e negativo respectivamente.

A capacidade de produção de biofilmes "in vitro" também foi determinada de acordo com o método citado por Cucarella et al. (2001), com pequenas modificações. As estirpes de *S. aureus* foram cultivadas individualmente, por uma noite, no TSB a 37°C e diluídas 1:200 no TSB contendo 0,25% de glicose. 200µL de células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo "U" e incubadas por 24 horas à 37°C com agitação. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) e logo após foi adicionado 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) e logo após foi adicionado 200µL de metanol para fixação e deixados até a secagem da placa, em torno de 15 minutos. Adicionou-se 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos, depois então lavou-se as placas com água destilada e após estarem secas adicionou-se 200µL de ácido acético a 33% para ser feita a leitura a 492nm (Thermoplate reader).

Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em duplicada e o teste foi repetido 3 vezes, sendo consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises fenotípicas quanto à produção de biofilme no Agar Vermelho Congo (CRA) revelaram que 251 de 316 (79,4%) isolados de leite de vacas e tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme "in vitro" e 65 (20,6%) destes não foram capazes de produzir biofilme "in vitro", enquanto que, 111 (89,5%) das estirpes isoladas de diversos pontos no ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme. Foi possível observar a formação de biofilme em estirpes isoladas tanto do leite de vacas com mastite, do leite tanque de expansão, quanto do ambiente de ordenha. Esses dados permitem justificar ainda mais, a importância da higienização dos equipamentos de ordenha, a fim de se evitar, a multiplicação microbiana com conseqüente formação de biofilmes e levando não só a perda material do equipamento quanto à contaminação constante do leite que passa por estes equipamentos.

Os *S. aureus* foram também avaliados fenotipicamente quanto à produção de biofilme no Teste de Microplacas (Mtp). Os resultados das análises revelaram que das 313, 263 (84%) dos isolados de leite de vacas e do leite do tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme "in vitro" e 50 (16%) destes não foram capazes de produzir biofilme "in vitro", enquanto que 108 (85%) das estirpes isoladas do ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme.

Quando analisados os dois testes fenotípicos verifica-se que todos os dois testes obtiveram resultados muito próximos para identificar a produção de biofilme conseguindo detectar 80% de produção de biofilme. Quanto a análise molecular foi possível observar que 90%, 97%, 99% e 98% dos isolados possuíam os genes *icaA*, *icaD*, *clfB* e *clfA* respectivamente.

MELO (2008) comparando a presença do gene *ica* com a produção de biofilmes pelos testes do CRA e Mtp verificou que alguns isolados de *S. aureus* que não possuíam gene *ica* foram capazes de produzirem biofilmes, fato este que pode ser explicado na presente pesquisa sobre a importância de outros genes, tais como *clfA*, *clfB*.

A presença dos produtos dos genes *clfA* e *clfB*, na presente pesquisa, nas estirpes de *S. aureus* isolados de casos de mastite e ambiente de ordenha reforça ainda mais a

importância de evitar que os microrganismos colonizem e possam aderir às superfícies, principalmente nos casos de mastite onde a presença da reação inflamatória e consequente formação de fibrinogênio auxilia na manutenção da bactéria nos alvéolos e a consequente formação de biofilmes; quase todos os isolados de *S. aureus* possuíam os genes *clfA* e *clfB*, fato este que pode ser associado a permanência dos microrganismos por todo o ano no ambiente de ordenha e nos animais avaliados.

CONCLUSÃO

A produção de biofilmes por estirpes de *S. aureus* e a presença dos produtos dos genes *icaAD* e *clfAB* enfatizam ainda mais a importância de um programa orientado de prevenção, evitando assim a formação de biofilmes e a persistência dos *S. aureus* no ambiente de ordenha e consequentemente nas vacas originando casos de mastite.

REFERÊNCIAS

- CUCARELLA, C. et al. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology.**, v.183, p. 2888-2896, 2001.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology.**, v. 42, p.872-874, 1989.
- GROSS, M.; CRAMTON, S.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in Staphylococcus aureus Colonization of Artificial Surfaces. *Infection and Immunity*, v.69, n.5, p. 3423-3426, 2001.**
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters.**, v. 236, p.163-173, 2004.
- MACK, D. et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3799-3807, 2000.
- MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina.** 2008. 103p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.
- PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HOOK, M. Mscramm-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p. 585-617, 1994.
- WOLZ, C.; GOERKE, C.; LANDMANN, R.; ZIMMERLI, W.; FLUCKIGER, U. Transcription of Clumping Factor A in Attached and Unattached Staphylococcus aureus In**

Vitro and during Device-Related Infection. Infection and Immunity, v.70, n.6, p. 2758-2762, 2002.