

ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DA PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA

PHENOTYPIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF BIOFILM PRODUCTION BY *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED OF BOVINE MASTITIS CASE

Poliana de Castro MELO¹; Luciano Menezes FERREIRA²; Antonio NADER-FILHO¹; Luiz Francisco ZAFALON³; Hinig Isa Godoy VICENTE⁴

1. Doutoranda em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil. policame@yahoo.com.br; 2. Médico Veterinário Autônomo, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 3. Embrapa Pecuária Sudeste CPPSE, São Carlos, SP, Brasil. 4. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESUMO: A formação de biofilmes é considerada uma vantagem que alguns *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina possuem, facilitando a permanência dos mesmos no úbere. Isto requer a adesão das bactérias no epitélio mamário com proliferação e formação de multicamadas de células envolvidas por uma matriz polimérica conhecida como exopolissacarídeo. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de biofilmes das estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. Estudou-se 94 estirpes de *S. aureus* obtidas do leite de vacas com mastite subclínica oriundas de duas propriedades rurais no estado de São Paulo. Essas estirpes foram caracterizadas quanto a produção de biofilmes pelos testes de aderência em microplacas e pela presença dos genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular. Os resultados obtidos revelaram que no teste de aderência em placas, 98,9% das estirpes produziram biofilme e a presença dos genes *icaA* e *icaD* foi encontrada em 95,7% das estirpes de *S. aureus*. Bactérias produtoras de biofilmes no epitélio mamário diminuem a efetividade dos antimicrobianos, por isso a detecção de *S. aureus* produtoras de biofilmes têm importância no entendimento da patogenia desse agente, além de permitir uma melhor adoção de medidas de prevenção e controle.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilmes. Genes *icaA* e *icaD*. Mastite bovina. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus destacam-se como microrganismos causadores de mastites contagiosas de maior importância, maior ocorrência nos rebanhos mundiais e de difícil tratamento devido à elevada resistência aos antimicrobianos. As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* representam importantes implicações em Saúde Pública, tendo em vista que as toxinas produzidas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos aos consumidores (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

As adesões dos *S. aureus* ao epitélio da glândula mamária são consideradas o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite sendo que, a maioria das estirpes dos *S. aureus* causadoras da doença são circundadas por uma camada espessa (“slime”), que auxilia na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (BASELGA et al., 1993; AGUILAR et al., 2001). A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio está associada à produção de

biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz.

Os biofilmes são constituídos de bactérias, as quais estão aderidas a qualquer superfície, que por sua vez são envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos. Em síntese, são depósitos, onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON et al., 1999).

Há vários outros polissacarídeos que compõem o “slime”, mas um polissacarídeo específico de alto peso molecular que tem a mesma função da cápsula bacteriana e intervém na aderência inicial das bactérias nas superfícies dos polímeros é chamado de polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) (ARCIOLA et al., 2001; GOTZ, 2002) e é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme protegendo as bactérias das defesas do hospedeiro e da fagocitose e está envolvido no primeiro passo da adesão primária, acompanhada da

proliferação das células em agrupamentos de multicamadas (ARCIOLA et al., 2001).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- β -1,6-glucosamina. A síntese é codificada pelo gene produto do locus *ica* do operon *icaABCD* e os genes e produtos do locus *ica* foram demonstrados fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos microrganismos e são regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, limitação de etanol e ferro (O'TOOLE et al., 2000).

O gene *icaA* representa atividade catalítica N-acetilglicosaminatransferase e que sozinha tem baixa atividade transferase, mas, quando é co-expressa com o gene *icaD* apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de b 1,6-N-acetil glicosamina (GALDBART et al., 2000, DOBINSKY et al., 2002, GOTZ, 2002).

A hipótese que infecções mamárias são associadas com a formação de biofilmes é também realçada pela falha na sensibilidade aos antimicrobianos. Em uma célula primária epitelial mamária os testes para sensibilidade de neomicina, neomicina com penicilina, neomicina com tetraciclina, neomicina com bacitracina, e tetraciclina com bacitracina foram mais sensíveis para células não aderentes de *S. aureus* que para células aderentes (HENSEN, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a produção de biofilmes por estirpes de *S. aureus* através do teste fenotípico e genotípico (presença dos genes *icaA* e *icaD*) isoladas de casos de mastite subclínica bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Análises microbiológicas e extração de DNA

Foram isoladas 94 estirpes de *Staphylococcus aureus* oriundos de casos de mastite subclínica bovina provenientes de dois rebanhos no estado de São Paulo no período de julho 2005 a julho de 2009. Todas as amostras de leite, oriundas de 80 vacas em lactação, foram submetidas ao teste do CMT e os tetos que se mostraram reagentes foram colhidas amostras de leite e encaminhadas ao laboratório de microbiologia para análise.

Após a semeadura do leite em placas de ágar, sangue a 5% e incubação a 37°C, durante 18 a 24 horas, foram submetidas à verificação morfológica em esfregaços corados pelo método de Gram. Aquelas que revelassem a presença de cocos Gram-positivos, dispostos ou não sob a forma de

cachos de uva, foram submetidas às provas da catalase e da coagulase lenta em plasma de coelho (HOLMBERG, 1973). As estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas, ainda, às provas para verificação da produção de acetoina (Caldo MRVP-Oxoid®, Hampshire, Inglaterra), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius*. As amostras que produziram acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e da trealose (Vetec®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie coagulans. As estirpes que mostraram-se positivas a estas provas foram classificadas como sendo de *Staphylococcus aureus* (HOLT et al., 1994).

Após as análises microbiológicas procedeu-se a extração do DNA bacteriano utilizando-se um KIT de purificação GFX Genomic Blood (Amersham, Biosciences).

Após a extração do DNA cromossomal, realizou-se a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), seguindo a metodologia descrita por Martineau et al. (1998), para identificação molecular das estirpes de *S. aureus*.

Teste fenotípico para avaliar a produção de biofilmes

Teste de Aderência em Microplacas

A capacidade de produção de biofilmes "in vitro" foi determinada de acordo com o método citado por Cucarella et al. (2001), com algumas modificações. As estirpes de *S. aureus* foram cultivadas individualmente, por uma noite, no caldo soja tripticase (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 sem agitação. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) secos a 60° C por 1 hora e logo após foram corados com 1% de solução cristal violeta por 1 minuto. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 492nm (Thermoplate reader). Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como teste em branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em duplicada e o teste foi repetido 3 vezes.

Foram consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al., 2000). As cepas controles utilizadas foram *S. aureus* ATCC 12228 (negativa) e ATCC

25923 (positiva).

Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos genes *icaA* e *icaD* foram descritos por Cramton et al. (1999). O volume de 20 μ L de reação final consistiu em 2.5mM MgCl₂, 200 μ M de cada nucleotídeo, 1 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25U de Taq polimerase e 100ng de DNA molde. As misturas de PCR foram submetidas a 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 (Mastercycler gradient, Eppendorf). A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 2% de gel de agarose corado com brometo de etídio. Foi utilizado um marcador de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil). As cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva). As seqüências dos oligonucleotídeos: *icaAF*:5'TCTCTTGCAGGAGC AATCAA3', *icaAR*:5'TCAGGCACTAACATCCA GCA3'; *icaDF*:5'ATGGTCAAGCCCAGACAGAG 3', *icaDR*:5'CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'.

Análise Estatística

Foi efetuado estudo estatístico, utilizando-se o teste do Qui-quadrado, para avaliar se houve significância entre os testes, o coeficiente de *Kappa*, que determinou se houve uma boa concordância entre os testes, a porcentagem de sensibilidade e especificidade entre os testes, e o valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). Estes testes foram realizados pelo programa de computador SAS (2002) no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível verificar que das 94 estirpes de *S. aureus* estudadas, 93 (98,9%) se aderiram fortemente à placa de poliestireno. Observou-se ainda que 90 (95,7%) das estirpes apresentaram os genes *icaA* e *icaD*.

Verificou-se nesse estudo que os genes *icaA* e *icaD* estiveram presentes na maioria das estirpes de *S. aureus*, demonstrando assim a importância dos mesmos nas estirpes produtoras de biofilmes, devendo-se levar em consideração o estudo destes genes para produção de novos medicamentos e vacinas para mastite bovina cujos agentes

etiológicos sejam os estafilococos. Vasudevan et al. (2003), estudaram estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica e encontraram 100% das estirpes com os genes *icaA* e *icaD*, e concluíram que a presença do locus *ica* em todos os *S. aureus* isolados de casos de mastite confirmam o potencial desse gene como fator de virulência na patogenia da mastite de ruminantes.

Arciola et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do biofilme, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de estirpes virulentas formadoras de biofilme. No presente estudo também foi possível afirmar a importância que esses genes representam, para caracterizarem molecularmente estirpes produtoras de biofilmes devido à alta frequência (95%) das estirpes *icaA* e *icaD* positivas, assim como já havia sido relatado por Vasudevan et al. (2003) e Arciola et al. (2002).

Estirpes de *S. aureus* foram investigadas quanto à presença do locus *ica* e sobre sua influência na formação de biofilmes. A produção de biofilmes *in vitro* pelo teste de aderência em placas ocorreu em 78% das estirpes positivas para o gene *icaA* e de 59% para o gene *icaD*, e a deleção do *ica* locus resultou na perda da habilidade de formar biofilmes. Outros experimentos revelaram que a presença do *icaA* em muitas espécies de *Staphylococcus* sp, está correlacionada com a adesão célula-célula e o potencial de formar biofilmes está relacionado a este gene (CRAMTON et al., 1999).

A análise da produção de biofilmes pela aderência em placas demonstrou que, 98,9% das estirpes se aderiram à placa e foram consideradas produtoras de biofilmes. Stepanovic et al. (2000) notaram que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos pelos *Staphylococcus* sp., além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos. Este teste cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pelos estafilococos sendo então possível verificar se as estirpes são boas formadoras de biofilme ou não.

No presente estudo também verificou-se que o teste de aderência em microplacas apresentou um ótimo resultado na expressão da produção fenotípica de biofilme por estirpes de estafilococos. O teste, porém apresentou uma porcentagem de resultados positivos maior que o teste genotípico, demonstrando assim um pequeno número de resultados falsos positivos quando a presença dos

genes foi utilizada como padrão de referência para estirpes produtoras de biofilmes, isto ocorreu devido a sua alta sensibilidade (100%) e baixa especificidade (25%), ou seja, o teste foi capaz de detectar uma porcentagem alta de resultados positivos e baixa de resultados negativos, sendo então recomendado como teste de triagem para a análise fenotípica da produção de biofilmes.

O teste de microplacas quando comparado com análise molecular apresentou um valor preditivo positivo (VPP) de 96,7%, e valor preditivo negativo (VPN) de 100%, isto significa que dos valores positivos, 96,7% foram realmente positivos, e todos (100%) os valores negativos, foram realmente negativos. Além disso a concordância dos testes medida pelo coeficiente *kappa* foi classificada como boa (0,39) e as análises estatísticas foram significativas (pois tiveram o valor de $p < 0,05$).

Sabendo-se que o processo de infecção da glândula mamária por estirpes de *S. aureus* ocorre via ascendente pelo canal do teto e, tendo em vista, a capacidade dos mesmos se aderirem e formarem biofilmes permanecendo nos alvéolos evidencia-se a importância da realização de antissepsia dos tetos, por meio da utilização do pré e pós-dipping na profilaxia da mastite.

O manejo profilático é o caminho adequado para prevenir a infecção e evitar a formação de biofilmes e, conseqüentemente, à alta resistência dos microrganismos, já que essa resistência dificulta o tratamento das mastites e pode aumentar os casos de infecções subclínicas. Sendo assim, justifica-se a importância de novos estudos para o conhecimento dos agentes formadores de biofilmes e seus mecanismos de adesão de forma a fornecer subsídios para a profilaxia da mastite bovina.

CONCLUSÃO

A grande maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* do leite bovino oriundos de quartos com mastite subclínica foi capaz de produzir biofilmes e apresentaram os genes *icaA* e *icaD*.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida durante a execução da pesquisa.

ABSTRACT: Biofilm formation is considered an advantage for *Staphylococcus aureus* mastitis isolates, facilitating bacterial persistence in the udder. It requires attachment to mammary epithelium, proliferation and accumulation of cells in multilayers and enclosing in a polymeric matrix known as exopolysaccharide. The objective of this study was to evaluate the ability of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis for formation of biofilms. A total of 94 *Staphylococcus aureus* strains obtained from milk samples of cows suffering from subclinical mastitis in dairy herds on two properties in the state of São Paulo were evaluated. These strains were characterized by in vitro biofilm formation, and by the presence of *icaA* and *icaD* genes which are responsible for intercellular adhesion. The results revealed that 98.9% of the isolates produced biofilm in vitro by adherence in sterile 96-well "U" bottom polystyrene tissue culture plates; 95.7% of the isolates possessed the *icaA* and *icaD* genes. These bacterial isolates biofilm producers may impair eradication of chronic mastitis, rendering antibiotherapy less effective. The detection of biofilm forming ability in mastitis isolates may provide useful information for more adequate therapeutic regimen and for preventive actions in the control of those bacterial isolates in bovine herds.

KEYWORDS: Biofilms. Bovine mastitis. *icaA*, *icaD* genes. *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Geneva, v. 82, p. 165-175, 2001.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2151-2156, 2001.

- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, North Carolina, v. 23, p. 4233-4239, 2002.
- BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 4857-4862, 1993.
- COSTERTON, J. W.; STEWART PHILIP, S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, New York, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
- CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, F. N.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is presente in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 5427- 5433, 1999.
- CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, R. J. *Bap* a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 2888-2896, 2001.
- DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *ica*A₁BC operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid**, Bethesda, v. 47, p. 10-17, 2002.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- GALDBART, J. O.; ALLIGNET, J.; TUNG, H. S.; RYDE`N, C.; SOLH, N. E. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **Journal of Infectious Diseases**, Arlington, v. 5, p. 351-355, 2000.
- GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, Baltimore, v. 43, n. 1367-1378, 2002.
- HENSEN, S. M.; PAVICIC, M. J. A. M. P.; LOHUIS, J. A. C. M.; HOOG, J. A. M.; POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 1966-1975, 2000.
- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinary Scandinavica**, London, v. 45, p. 1-144, 1973.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. ; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787 p.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Species-specif and ubiquitous DNA based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.
- MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K. M.; ELSNER, H. A.; FEUCHT, H. H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 3799-3807, 2000.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. **User's Guide**: stat. Release 8.1 Edition. Cary: SAS INSTITUTE INC, 2002. 1292 p.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, Columbia, v. 40, p. 175-179, 2000.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Geneva, v. 92, p. 179-185, 2003.