

## FORMAÇÃO DE BIOFILME E PRESENÇA DOS GENES *icaA* e *icaD* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE

ISABELA SCHNEID<sup>1</sup>; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS<sup>2</sup>; LOUISE HAUBERT<sup>2</sup>;  
DARLA SILVEIRA VOLCAN<sup>2</sup>; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA<sup>2</sup>; WLADIMIR  
PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [isabelaschneid@gmail.com](mailto:isabelaschneid@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maryanaiglesias@hotmail.com](mailto:maryanaiglesias@hotmail.com); [louisehaubert@hotmail.com](mailto:louisehaubert@hotmail.com)  
[darlavolcan@yahoo.com.br](mailto:darlavolcan@yahoo.com.br); [tkvgandra@yahoo.com.br](mailto:tkvgandra@yahoo.com.br);

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A mastite, uma das doenças mais importantes do rebanho leiteiro, é uma inflamação clínica ou subclínica que prejudica a saúde e o bem-estar animal e é acompanhada pela diminuição da produção de leite, aumento de cuidados de saúde, de custos, de taxas de abate e, por vezes, até mesmo levando a morte do animal. Além disso, quando a mastite é infecciosa, os micro-organismos causadores podem contaminar o leite. *S. aureus* é o micro-organismo com maior ocorrência em casos de mastite e o segundo mais envolvido em casos de doenças transmitidas por alimentos (MELCHIOR; VAARKAMP; GREMMELS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A formação de biofilmes é considerada uma vantagem que alguns *S. aureus* isolados de mastite bovina possuem, facilitando a sua permanência no úbere, utensílios de ordenha além da persistência da doença. Isto requer a adesão das bactérias no epitélio mamário com proliferação e formação de multicamadas de células envolvidas por uma matriz polimérica, conhecida como exopolissacarídeos (MELO et al., 2012).

A capacidade deste micro-organismo se aderir às superfícies se dá por meio de um antígeno capsular chamado de polissacarídeo adesina (PS/A). A formação de multicamadas de células no biofilme está associada com a produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA). O operon *ica*, responsável pela produção de biofilme, é formado por quatro genes (*icaADBC*) e está presente em grande parte dos *S. aureus* estudados (GÖTZ, 2002). Dos genes deste operon, *icaA* e *icaD*, são relatados como os mais importantes na formação de biofilmes em *S. aureus* (VASUDEVAN et al., 2003).

Dentro do exposto o objetivo do estudo foi avaliar a formação de biofilme em 25 isolados de mastite bovina, bem como verificar a presença dos genes *icaA* e *icaD*, relacionados a formação de biofilme.

### 2. METODOLOGIA

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram utilizados 25 isolados de mastite clínica e subclínica provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF).

A análise de avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo o protocolo proposto por STEPANOVIC et al. (2007), utilizando-se placas

de microtitulação (ELISA). A densidade óptica (DO) de cada amostra foi mensurada por espectrofotometria. Como controles foram utilizados as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 6538.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para se identificar a presença dos genes *icaA* e *icaD*, relacionados com a formação de biofilme, segundo protocolo descrito por VASUDEVAN et al. (2003), com adaptações. Foram utilizados, como controle positivo e controle negativo, a cepa *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), empregando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa STATSOFT versão 7,0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na capacidade de formação de biofilme (aderência em microplaca), entre os isolados de *S. aureus*, conforme ilustrado na Figura 1.

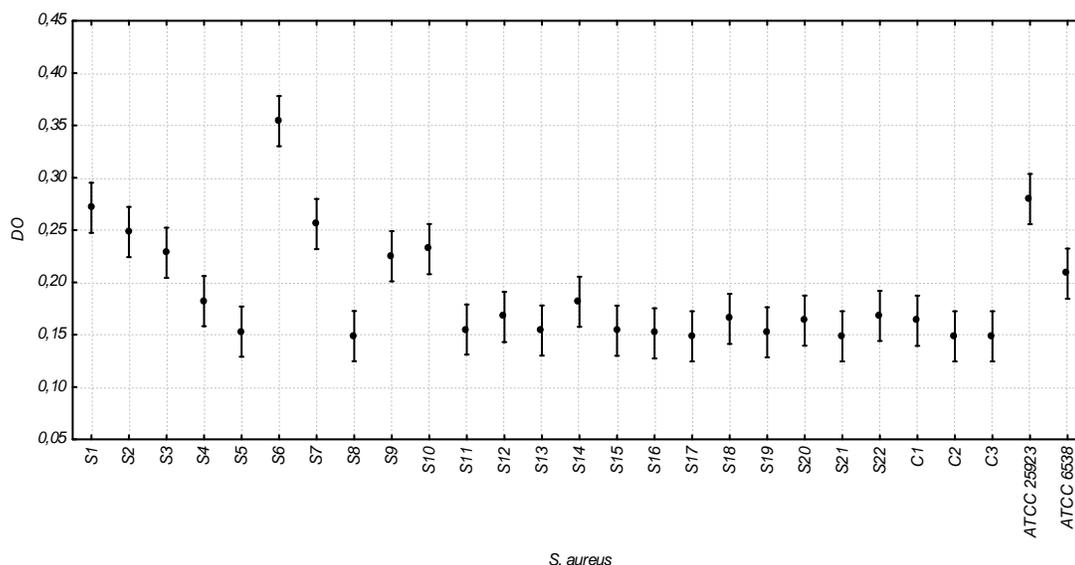


Figura 1 – Média de DO dos isolados de *S. aureus* obtidas para avaliação da capacidade de formação de biofilme

Através do teste de Tukey, pode-se observar que a maior média de DO foi encontrada no isolado S6 (0,354) que diferiu significativamente na capacidade de produção de biofilme de todos os outros isolados avaliados, inclusive das duas cepas padrão utilizadas.

Os isolados S1, S2, e S7 não diferiram entre si e apresentaram capacidade de produção de biofilme significativamente superior a 70,37% dos demais isolados testados. Da mesma forma os isolados S3, S9 e S10 não diferiram entre si e apresentaram capacidade de produção de biofilme significativamente superior a 62,96% dos demais isolados testados. A cepa ATCC 25923 não diferiu dos grupos S1, S2, S7 e S3, S9, S10, mas diferiu da cepa ATCC 6538 e apresentou capacidade de produção de biofilme significativamente superior a 77,77% dos demais *S. aureus* testados.

Em relação à formação de biofilme, MELO et al. (2014) verificaram que 98,9% dos isolados de *S. aureus* provenientes de mastite se aderiram à microplaca de poliestireno e 95,7% dos isolados carregavam os genes *icaA* e *icaD*, apresentando assim, maior ocorrência de formação de biofilme e presença dos genes do que o observado neste estudo.

Dentre os 25 isolados, a presença do gene *icaA*, foi observada em 80% (20/25) e do gene *icaD*, em 76% (19/25) dos isolados testados, logo, estes isolados apresentam grande potencial genético para a formação de biofilme.

Relacionando-se a formação de biofilme com a presença dos genes *icaA* e *icaD*, observou-se a presença desses genes na maioria dos isolados, no entanto apenas 11 isolados (44%), tiveram capacidade de formação de biofilme (aderência em microplaca) na temperatura de 37°C, temperatura utilizada por ser a ideal para o crescimento do micro-organismo e também a temperatura corporal do animal, já que se tratam de isolados clínicos provenientes de mastite bovina.

Cabe ressaltar que a presença do gene indica que o isolado tem capacidade de formação de biofilme, no entanto, a expressão do gene pode variar quando o isolado é submetido a condições adversas como temperatura, diferentes concentrações de antimicrobianos/sanitizantes, falta de nutrientes, entre outras, pois este fator de virulência é uma estratégia de sobrevivência do micro-organismo. Segundo STANLEY e LAZZERA (2004) os genes do *locus ica* são regulados em resposta a fatores ambientais, tais como baixo teor de glicose, anaerobiose, falta de ferro, alta osmolaridade e temperatura, sendo estes genes considerados fundamentais para a formação dos biofilmes e resistência dos micro-organismos a condições adversas.

Além dos genes *ica*, existem outras proteínas responsáveis pela adesão dos micro-organismos, como é o caso da *bap*. Segundo CUCARELLA et al., 2001 *bap* promove tanto a ligação primária a superfícies inertes, quanto a adesão intracelular, uma vez que PIA parece estar envolvido apenas na adesão intracelular. Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. utilizados por aqueles autores, que apresentavam o gene *bap*, foram fortemente aderentes e fortes produtores de biofilme o que influencia na patogênese, e causa a persistência da infecção. Dessa forma, o gene *ica* não é o único responsável pela capacidade de adesão, sendo influenciado por uma série de outros fatores ambientais e genéticos.

VASUDEVAN et al. (2003) ao analisarem isolados de *S. aureus* de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, encontraram os genes *icaA* e *icaD* em 100% dos isolados, confirmando o potencial desses genes como fator de virulência na patogenia da mastite de ruminantes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os isolados de mastite clínica e subclínica avaliados neste estudo são formadores de biofilme e a maioria possui os genes *icaA* e *icaD*, portanto, apresentando potencial de virulência para a disseminação da doença no rebanho leiteiro e para a contaminação do leite e utensílios de ordenha pela formação de biofilmes.

Mais estudos serão realizados para relacionar a formação de biofilme com a presença dos genes do *locus ica* e outros genes relacionados à virulência deste importante patógeno.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.**, V. 43, p. 1367–1378, 2002.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal** 171 398–407, 2006.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I, G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/>> Acesso em: 10 de junho de 2014.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Mol. Microbiol.**, v.52, n.4, p.917-924, 2004.

STATSOFT, Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual. Tulsa: StatSoft, Inc., 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, 891–9, 2007.

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**. v. 92 p. 179-185, 2003.