

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS* ISOLADO DAS MÃOS DE ORDENHADORES-DADOS PRELIMINARES

ROBERTA VÖLZ KRAUSE¹; **JULIANA FERNANDES ROSA²**; **KATLYN FLAVIA**
RODRIGUES SOARES²; **RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO²**
HELENICE DE LIMA GONZALEZ²; **NATACHA DEBONI CERESER³**

¹*Universidade Federal de Pelotas 1 – robertakrauservk@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – ju_fernandes.r@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – soaresflaa@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – natachacereser@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus* é um dos micro-organismo presente no ambiente de ordenha e também é considerado um dos principais causadores de mastite, sendo capaz de produzir grande variedade de enterotoxinas, podendo a levar a infecções alimentares ou doenças gastrointestinais (LUCHEIS, 2012). Sendo assim, a higiene correta no manejo de ordenha das vacas torna-se necessária para garantir sua segurança em todos os estágios de produção, diminuindo os riscos para a saúde pública.

Os micro-organismos podem aderir às superfícies, interagindo com as mesmas e iniciando a multiplicação celular (OLIVEIRA et al., 2006). A formação de biofilme corresponde a uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, imbebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, no qual exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003).

Os biofilmes possuem caráter protetor aos micro-organismos, tornando, assim, uma fonte de contaminação resistente à ação de agentes químicos e físicos, como sanitizantes empregados nos processos de higienização (SIMÕES et al., 2010; PARK et al., 2012).

Os manipuladores constitue-se como fonte de contaminação para os produtos lácteos, pelo contato manual ou pelo trato respiratório, no entanto, a contaminação do leite cru pelo próprio animal ou por infecções não pode ser negligenciada, além da contaminação do leite pelas mãos do ordenhador, seja na ordenha manual ou mecânica, também pela contaminação dos equipamentos de ordenha e do próprio ambiente da sala de ordenha (LUCHEIS, 2012).

Devido o grau de importância para saúde pública, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de mãos de ordenhadores.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo do inóculo

Os 29 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva utilizados nesse trabalho são oriundos de amostras coletadas de mãos de ordenhadores, de sete propriedades da região sul do Rio Grande do Sul, que participam do projeto de extensão “Manejo de ordenha e qualidade do leite em propriedade do sul do Rio Grande do Sul”. As mostras foram obtidas no período de 2014 a 2016 e mantidas estocados em glicerol e caldo infusão cérebro e coração (BHI, Acumedia) a -18°C.

2.2 Ensaio de formação de biofilme

O procedimento adotado para realizar este ensaio segue o recomendado por STEENACKERS et al. (2011), com modificações. Inicialmente os isolados foram recuperados em caldo tripticase de Soja (TSB Acumedia) e incubados a 37°C por 24 horas, sendo realizados dois repiques.

Passado esse processo, cada isolado foi padronizado em espectrofotômetro (A_{600nm}) para o valor de 0,9 – 1,0 de densidade ótica (DO). Após a padronização dos isolados, o meio de cultura (TSB) foi distribuído em uma placa de 96 cavidades (Nunc, Thermo Scientific) para verificar a formação de biofilme. A densidade ótica de cada cultivo foi ajustada e esta diluição foi semeada em cada cavidade da placa. A placa recebeu uma tampa onde o biofilme é formado. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após, as tampas das placas (Nunc-TSP, Thermo Scientific) foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, estas foram lavadas com água destilada estéril, secas a temperatura ambiente por 30 minutos e colocadas em ácido acético a 30%. Após a remoção da tampa, a leitura por densidade ótica utilizando um espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 600nm e de 570nm para o biofilme. O caldo TSB estéril foi utilizado como controle negativo e o controle positivo foi uma cepa de *Staphylococcus* coagulase positiva fortemente formadora de biofilme. Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras. Como o experimento foi realizado em triplicata, os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos e cada isolado foi agrupado nas quatro categorias selecionadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 29 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva testados neste trabalho, foram obtidos como forte formador de biofilme um (3,5%) isolado, 12 (41,4%) moderado formador, 14 (48,3%) como fraco formador, restando apenas dois (6,9%) não formadores de biofilme. Esses resultados são preocupantes pois geraram resultados que superam os índices de formação de biofilme obtidos por GUIMARÃES et al. (2012), que avaliaram isolados de *Staphylococcus* obtidos de casos de mastite de bovinos e bubalinos e verificaram que das 30 amostras bovinas analisadas, 17 (56,7%) foram classificadas como não formadoras de biofilme, 10 (33,3%) fracamente formadoras e três (10,0%) fortemente formadoras, totalizando 13 (43,3%) isolados produtores de biofilme.

MELO et al. (2012) verificaram percentuais maiores de formação de biofilme de *Staphylococcus* oriundos de amostras de mastite subclínica bovina, já que de 94 cepas de *Staphylococcus aureus* estudadas, 93 (98,9%) aderiram fortemente à placa de poliestireno.

Estudos e resultados citados neste trabalho demonstram que existem grupos de *Staphylococcus* não formadores e grupos formadores de biofilme, sendo estes encontrados mais facilmente, gerando preocupação, pois a formação

de biofilme ajuda a bactéria a sobreviver em ambientes hostis dentro do hospedeiro, e esse é um fator responsável por infecções crônicas e ou persistentes (COSTERTON et al., 1999). Este tipo de organização do biofilme é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades, como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer a resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003).

Podemos constatar que as mãos de ordenhadores pode se constituir em importante fonte de contaminação e transmissão, especialmente do *Staphylococcus aureus*, micro-organismo parasita da pele. Relacionando com os resultados obtidos no trabalho, em que 93,1% dos isolados foram classificados como biofilme-positivo, há um aumento da disseminação de *Staphylococcus* por todo ambiente de ordenha, e caso não seja realizada uma higiene correta, o agente poderá ser veiculado ao leite pelo contato com equipamentos, utensílios e superfície dos tetos, elevando os níveis de isolados formadores de biofilme em todo processo de obtenção do leite e derivados, o que acarretará em altos riscos ao consumidor.

A formação de biofilme em superfícies de contato com alimentos pode ser controlada por meio da limpeza, utilizando métodos químicos e físicos, porém as bactérias que vivem em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos e difíceis de serem removidas mecanicamente (SIMÕES et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos até o momento, é possível destacar que a maioria das cepas de *Staphylococcus coagulase* positiva presentes nas mãos dos ordenhadores apresentam capacidade de formar biofilme. Tratando-se de um dos micro-organismos mais importantes quanto às doenças de origem alimentar, a sua capacidade de se aderir em diferentes locais pode aumentar a chance de contaminação do leite, diminuindo a vida útil dos derivados e trazendo riscos à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.
- GILBERT, P.; MC BAIN, A. J.; RICKARD, A H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: **a problem of control**. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.51, 4, 245-248, 2003.
- GUIMARÃES, G.; FRANCA, C.A.; KRUG, F.S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1219-1224, 2012.
- LUCHEIS, S. B.; Vigilância para *staphylococcus aureus* produtores de toxinas em leite. **Pesquisa e tecnologia**, vol. 9, n. 1, Jan-Jun 2012.
- MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise Fenotípica e Molecular da Produção de Biofilme por Estirpes de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Casos de Mastite Subclínica Bovina. **Biosci.** J. 28, 1, 94-99, 2012.
- OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.
- PARK, S.H. et al. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.154, n.3, p.130-134, 2012.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergente biofilm control strategies. **LWT- Food Science and Technology**, v.43, p. 573-583, 2010.
- STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; De COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E.V.; DE VOS, D.E.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S.C.J. Structure-activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2Nsubstituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic Medical Chemistry**, v.19, 3462-3473, 2011.