

STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSIVITA FORMADOR DE BIOFILME ISOLADO DE EQUIPAMENTOS DE ORDENHA

ELISA ROCHA DA SILVA¹; BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER²; WESLEYPORTO DE OLIVEIRA²; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO²; HELENICE DE LIMA GONZALES²; NATACHA DEBONI CERESER³

¹ Universidade Federal de Pelotas – elisasilva.vet@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – bruna.draber@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – mvetwesley@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzales@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são aquelas causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTHA no mundo, podendo ser provocadas por bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas intestinais oportunistas ou substâncias químicas (BRASIL, 2020).

Dentre os possíveis causadores de DTHA, destaca-se o gênero *Staphylococcus*, de importância para a saúde pública. São bactérias gram-positivas que se distribuem em múltiplos planos para formar aglomerados irregulares. Não formam esporos, não têm flagelos e não são móveis (SMELTZER; BEENKEN, 2016).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um agente causador de doenças em todo o mundo, que acarreta grandes prejuízos e riscos à saúde humana e animal. Isto ocorre devido à grande capacidade que este microrganismo possui de adquirir genes que codificam a produção de biofilmes, toxinas e, também resistência a antimicrobianos (FANIN et al., 2020).

A contaminação de água e alimentos por *S. aureus* é comum, pois este microrganismo faz parte da microbiota normal de seres humanos, facilitando o processo de contaminação (JÚNIOR et al., 2019). Alimentos contaminados por *Staphylococcus* spp. de origem humana podem ser reduzidos mediante diminuição da manipulação, higiene dos manipuladores e adoção de boas práticas de manipulação (ASSUMPÇÃO et al., 2003).

Entende-se por biofilme bacteriano uma comunidade complexa composta por uma única ou diversas espécies de microrganismos, estes, se encontram aderidos a uma superfície e revestidos por uma camada heterogênea de matriz extracelular que é capaz de diferenciar o ambiente onde estão presentes (NASCIMENTO; SENA, 2017).

Estudos científicos demonstram que biofilmes formados em superfícies de equipamentos de ordenha afetam negativamente a segurança de produtos alimentícios e constituem perigo para a saúde humana (KUKHTYN et al., 2017), sendo necessária, portanto, uma correta higienização.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de equipamentos de ordenha.

2. METODOLOGIA

Os 70 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva utilizados nesse trabalho são provenientes de amostras coletadas de equipamentos de ordenha (teiteiras), 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 . O procedimento adotado para realizar o ensaio de formação de biofilme 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 (A600nm) 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 a 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 ótica 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

Dos 70 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva testados, apenas nove (12,8%) não demonstraram a capacidade de formar biofilme, 30 (42,9%) eram fracos formadores de biofilme, 17 (24,3%) formaram biofilme moderado e 14 (20,0%) eram fortes formadores de biofilme (Figura 1). Estes resultados superaram os obtidos por LEE et al. (2014), que ao avaliarem amostras de leite, diferentes ambientes da sala de ordenha, equipamentos de ordenha e mãos de ordenhadores, verificaram que de 31 amostras analisadas 17 (54,8%) não formaram biofilme, enquanto que 14 (45,2%) classificaram-se como formadores, sendo que dessas, nove fracos formadores, dois moderados formadores e três fortes formadores de biofilme.

GAJEWSKA e CHAJECKA-WIERZCHOWSKA (2020) coletaram 30 amostras de leite cru obtidos de fazendas leiteiras na Polônia, isolando 54 amostras de *Staphylococcus*. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme. A maioria das cepas (79,6%) formou biofilme forte, 5,6% biofilme moderado e 14,8% produziram biofilme fraco.

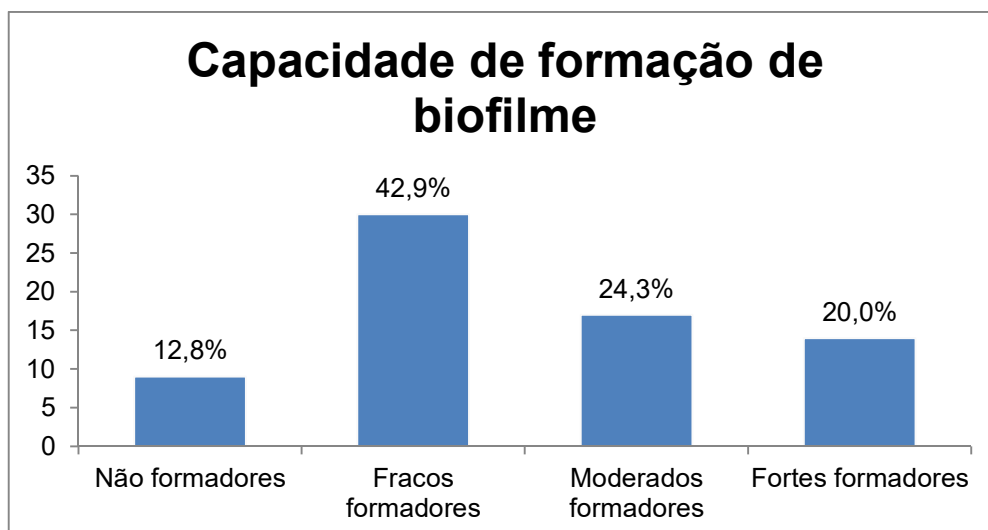


Figura 1 – Capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados em equipamentos de ordenha de sete propriedades da região sul do Rio Grande do Sul, no período de 2014 a 2016.

É possível constatar que equipamentos de ordenha, quando higienizados incorretamente, constituem uma importante fonte de contaminação de *Staphylococcus* spp. e que a devida higienização é de suma importância para evitar a disseminação do patógeno. KUKHTYN et al. (2017) ressaltam que para higienizar eficientemente os equipamentos de laticínios, é necessário empregar desinfetantes que afetam as bactérias nos biofilmes.

Os equipamentos utilizados em indústrias alimentícias têm predisposição a grande contaminação, principalmente quando higienizados de forma inadequada, o que propicia o desenvolvimento de microrganismos patogênicos podendo contaminar o produto final (CARVALHO et al., 2019).

Compreender os mecanismos e fundamentos genéticos responsáveis pela formação dos biofilmes é um elemento significativo que permite a implementação de medidas adequadas para prevenir a sua formação (GAJEWSKA; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, 2020).

4. CONCLUSÕES

Concluimos com esse trabalho que 87,2% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva testados apresentaram a capacidade de produção de biofilme. Evidenciando os equipamentos de ordenha como possíveis fontes de contaminação para o leite, o que pode conferir sérios riscos à saúde humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUMPÇÃO, E.G.; PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.3, p.366-370, 2003.

BRASIL. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Ministério da Saúde, 16 nov. 2020. Acessado em 28 jul. 2022. Online. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>

CARVALHO, A.C., RIBEIRO, R.A., ZAGO, S., BONNAS, D. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.16, n.30, p.311-325, 2019.

FANIN, M. et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.14, n.1, p.24–32, 2020.

GAJEWSKA, J.; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive *Staphylococci* Isolates from Raw Cow's Milk. **Pathogens**, Coventry, v.9, n.8, p.1-12, 2020.

JÚNIOR, F.P.A.; LIMA, B.T.M.; ALVES, T.W.B.; MENEZES, M.E.S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.18, n.1, p.89-93, 2019.

KUKHTYN, M. et al. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. **Eastern-European Journal of Enterprise Technologies**, Ucrânia, v.5, n.11, p.26–33. 2017.

LEE, S.H.I. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, n.3, p.1812 – 1816, 2014.

NASCIMENTO, I.R.; SENA, T.L. **Biofilmes bacterianos: colonização e identificação de micro-organismos causadores de infecção em cateter venoso central**. 2017. Relatório de Iniciação Científica – Centro Universitário de Brasília

SMELTZER, M.S.; BEENKEN, K. E. *Staphylococcus*. In: MCVEY, Scott. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016, Cap.26, p.189-198.

STEENACKERS, H.P.L. et al. 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, p.3462-3473, 2011.