

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PROPRIEDADE LEITEIRA

PHENOTYPIC EVALUATION OF BIOFILM PRODUCTION BY *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM DAIRY PROPERTY

Poliana de Castro Melo¹; Viviane de Souza²; Camila Chioda de Almeida³; Antonio Nader Filho⁴; Maria Izabel Merino de Medeiros⁵; Paulo Pinto Gontijo Filho⁶.

¹Doutoranda em Medicina Veterinária Preventiva, UNESP Jaboticabal-SP.

²Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos Sobral-Ce.

³Bolsista de Apoio Técnico Cnpq, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP Jaboticabal-SP.

⁴ Professor Titular Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP Jaboticabal-SP.

⁵Pesquisadora ITAL-APTA Campinas-SP.

⁶ Professor Titular, Instituto de Biociências, UFU, Uberlândia-MG.

Palavras-Chaves: leite, mastite bovina, microrganismos.

Introdução

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, ou seja, 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). 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* que causam mastite são circundadas por uma camada espessa ("slime"), que ajuda na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (AGUILAR et al., 2001). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar fenotipicamente a biomassa de biofilme produzida por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina e ambiente de ordenha, pelos testes de microplacas e ágar vermelho congo.

Material e Métodos

Foram avaliadas 440 estirpes de *S. aureus* isolados de agosto de 2008 a Setembro de 2009, em uma propriedade leiteira no estado de Minas Gerais. A avaliação pelo método do Agar Vermelho Congo seguiu a metodologia de FREEMAN et al, 1989, sendo que as placas contendo o ágar foram inoculadas e incubadas à 37°C por 24 horas, seguidas 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. Para a realização do teste de microplacas, as estirpes de *S. aureus* foram cultivadas, por uma noite, no TSB a 37°C e diluídas 1:200 no TSB contendo 1,5% 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. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) secos à 60° C por 1 hora, corados com 1% de solução cristal violeta por 1 minuto e logo após foi adicionado 200µL de ácido acético 33% e assim feita a leitura no espectrofotômetro na absorvância de 570nm. O teste foi feito em duplicata e repetido 3 vezes, foi considerada positiva as estirpes com absorvância maior do que 0,1 (MACK et al, 2000).

Resultados e Discussão

Os resultados das análises de Agosto de 2008 a Setembro de 2009 revelaram por meio do teste do ágar vermelho congo que 251 dos 316 (79%) dos isolados de *S. aureus* oriundos do leite de vacas com mastite subclínica e do tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme “in vitro” e 65 (21%) destes isolados não foram capazes de produzir biofilme “in vitro”. Dos isolados do ambiente de ordenha, 111 dos 124 (89%) isolados do ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme. Foi possível observar a formação de biofilme em estirpes isoladas tanto do leite, do tanque, quanto do ambiente de ordenha. Para o teste de microplacas 263 (83%) dos 316 isolados de leite, tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme “in vitro” e 53 (17%) destes não foram capazes de produzir biofilme “in vitro” sendo que 109 dos 124 (87%) isolados do ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme. Analisando os dois testes fenotípicos verificou-se que todos os dois tiveram resultados muito próximos para identificar a produção de biofilme e todos dois testes conseguiram detectar 80% de produção de biofilme. JAIN & AGARWAL (2008) estudaram a importância dos métodos fenotípicos Agar Vermelho Congo (CRA) e Teste Microplacas para avaliar o potencial de um microrganismo ser produtor de biofilme de *Staphylococcus* sp e concluíram que os dois testes apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade para detectar microrganismos produtores de biofilmes.

Conclusões

Torna-se importante a realização correta da higienização dos equipamentos de ordenha, e a monitorização constante das superfícies dos mesmos a fim de se evitar, a multiplicação microbiana com conseqüente formação de biofilmes e levando não só a perda do equipamento quanto à contaminação constante do leite que por estes passa, sendo então aplicável os testes fenotípicos para avaliar a presença de estafilococos produtores de biofilmes.

Referências Bibliográficas

- AGUILAR, B et al. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p.165-175, 2001.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.
- 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.
- JAIN, A & ARGAWAI, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.
- 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.

Autor a ser contactado: Poliana de Castro Melo, Depto de Med. Vet. Preventiva UNESP Jaboticabal-SP e Laboratório de Microbiologia Aplicada UMINHO, Portugal – email: policame@yahoo.com.br