



ATUAÇÃO DE DESINFETANTES SOBRE BIOFILMES EM FORMAÇÃO E CONSOLIDADO DE *Staphylococcus aureus* OBTIDOS DO LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

ISADORA LIMA COELHO; KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES; DANIEL DIAS DA SILVA; RAYLLA DA SILVA DIAS; ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS

RESUMO

Objetivou-se avaliar a ação de desinfetantes utilizados na ordenha sobre biofilmes em formação e consolidado de *Staphylococcus aureus* obtidos do leite de vacas com mastite subclínica. Foram selecionadas 10 fazendas vinculadas à uma indústria de beneficiamento de leite sob registro federal. Amostras de leite de 960 animais com mastite subclínica foram submetidas ao exame microbiológico. *Staphylococcus spp.* foram selecionados e caracterizados quanto ao perfil bioquímico e presença do gene femA para identificação de *S. aureus*. Foi avaliada a ação de dois desinfetantes utilizados no pré e pós dipping a base de clorexidina (2%) e ácido láctico (2%), sobre biofilmes em formação e consolidados de 86 isolados de *S. aureus*, que inicialmente foram classificados fenotipicamente em fortes e moderados produtores de biofilmes. Observou-se excelente taxa de redução para biofilme em formação, nesse contexto, o ácido láctico apresentou melhor resultado, com 100% de redução, enquanto para clorexidina foram observados 94,2%. Já, para o biofilme consolidado o percentual de ação foi bem inferior, o ácido láctico apresentou baixa eficácia sobre o biofilme já formado, com 3,5% da taxa de redução, enquanto a clorexidina conseguiu reduzir 43% do biofilme consolidado. Conclui-se que os produtos testados apresentaram elevada redução na taxa de adesão de todos os isolados. No entanto, a ação sobre os biofilmes consolidados foi mais expressiva para o produto à base de clorexidina. Percebe-se a necessidade da utilização de desinfetantes que atuem tanto nos microrganismos isolados quanto em biofilmes. E de programas mais rigorosos no manejo de ordenha para controlar a mastite e prevenir a adesão e formação de biofilmes por *S. aureus*.

Palavras-chave: bovinos leiteiros; doenças infecciosas; microorganismos patógenos, isolados bacterianos; atividade antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária, é uma enfermidade de origem pluri-etiológica e multifatorial, associada à redução da produção e alterações na composição do leite, bem como ao descarte de animais (BARLOW, 2011). Ela pode se apresentar como clínica, de acordo com o quadro sintomático ou subclínica, em que os sinais não são evidenciados, e de acordo com agente causador da infecção pode ser classificada em ambiental ou contagiosa (SILVA *et al.*, 2013). A mastite é a inflamação mais frequente em animais destinados a produção leiteira e a afecção mais onerosa para pecuária deste ramo

(ACOSTA *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus causador da mastite, possui a capacidade de produzir uma estrutura denominada biofilme, que é responsável pela sobrevivência e muitas vezes pela resistência a ação de produtos desinfetantes e as demais condições adversas. Dessa forma, enfatiza-se o uso de um esquema sanitário eficaz contra o desenvolvimento de fontes de infecção no decurso do manejo dos animais, antes e após a ordenha (PEIXOTO *et al.*, 2015).

O processo de antissepsia dos tetos através do pré-dipping e pós-dipping é uma prática amplamente recomendada no controle da mastite, por reduzir o número de microrganismos na pele do teto e curar lesões pré-existent. Para patógenos contagiosos como *S. aureus*, a antissepsia dos tetos após a ordenha permanece como uma prática simples, efetiva e economicamente viável na prevenção de novas infecções intramamárias. Entretanto, a imersão das tetas não oferecem a mesma proporção de proteção contra a enorme quantidade de bactérias que causam a mastite bovina (SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, a exposição in vitro prolongada aos banhos germicidas das tetas pode aumentar a resistência de algumas bactérias a anti-sépticos químicos (AZIZOGLU *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado a eficácia de diferentes produtos utilizados para desinfecção dos tetos antes e após a ordenha frente a *Staphylococcus spp.*, contudo investigações acerca da eficácia desses desinfetantes sobre biofilmes em formação e consolidados ainda são escassos. Diante disto, objetivou-se com esse estudo, avaliar a ação de desinfetantes utilizados na ordenha sobre biofilmes em formação e consolidado de *Staphylococcus aureus* obtidos do leite de vacas com mastite subclínica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 10 fazendas que forneciam leite à uma usina de beneficiamento sob serviço de inspeção federal (SIF). As propriedades pertenciam aos estados de Alagoas (6) e Pernambuco (4). Foi realizado o exame físico da glândula mamária e do leite dos animais e, em seguida, realizado o California Mastitis Test. Foram coletadas amostras de leite de 960 animais com mastite subclínica para o exame microbiológico, a coleta foi realizada após antissepsia do óstio dos tetos com álcool 70°GL.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. No laboratório, alíquotas de 10 µL de leite foram semeadas em ágar sangue ovino a 5% e, em seguida, as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Após a caracterização morfológica, 213 *Staphylococcus spp.* foram identificados e caracterizados quanto ao perfil fenotípico. Alíquotas dos isolados foram semeadas em caldo TSB e incubados a 37 °C overnight. O DNA das culturas foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA).

Todos os isolados que apresentaram perfil fenotípico compatível com *S. aureus* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR - desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos) para confirmação pela detecção do gene *femA*, exclusivo dessa espécie (MEHROTRA *et al.*, 2000). O protocolo utilizado foi o descrito por Dias *et al.* (2011).

A avaliação fenotípica de produção de biofilme foi avaliada de acordo com metodologia adaptada de Rodrigues *et al.* (2010). Cada cepa foi isolada em Caldo Triptona Soja (Himedia ®) até turvação 0.5 na escala McFarlan e incubadas a 37°C por 24h. Alíquotas de 100µL da solução foram inoculadas em placas de microdiluição de 96 poços e incubados a 37°C/24h. O conteúdo de cada poço foi aspirado e a placa foi lavada três vezes com água destilada estéril. Após a secagem das placas à temperatura ambiente, as células aderidas foram coradas com 100µL de violeta de genciana a 0,25% e após 3 minutos os poços foram lavados, novamente por três vezes com água destilada e submetidos à secagem em

temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200µL de álcool:acetona (80:20) e seguiu-se com a leitura da densidade óptica (DO) por espectrofotometria a 620nm. Para classificação dos isolados quanto à produção de biofilmes, foi medida a densidade óptica média (DO) do controle negativo (DOCN) e comparada com a DO média dos isolados (DOIS), sendo estes classificados como: negativo ($DOIS < DOCN$); fraco ($DOCN < DOIS < 2 \times DOCN$); moderado, ($2 \times DOCN < DOIS < 4 \times DOCN$); e forte ($4 \times DOCN < DOIS$) formadores de biofilmes (MERINO *et al.*, 2009). Para o teste foram utilizados poços em triplicata contendo Caldo Triptona Soja como branco, cepa controle positivo e cepa controle negativo.

Para avaliar a ação dos desinfetantes, os isolados classificados como fortes e moderados formadores de biofilme foram selecionados e submetidos ao teste com clorexidine (2%) e Ácido láctico (2%), desinfetantes que são utilizados diariamente na rotina de desinfecção dos tetos nas fazendas estudadas. Foi avaliada a ação dos desinfetantes na formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* e à capacidade de interferência no biofilme consolidado de acordo com Peixoto *et al.* (2015), com adaptações, utilizando-se as placas de microdiluição de 96 poços. Para avaliar a ação dos desinfetantes sobre o biofilme em formação, colônias de *Staphylococcus aureus* foram inoculadas em 3 mL de caldo Triptona Soja (Himedia ®) até turvação 0.5 na escala de McFarland e incubadas a 37°C/24h. O conteúdo de cada poço foi aspirado e foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. Após secagem da placa em temperatura ambiente, adicionou-se 200µl de violeta de genciana a 0,25% durante 5 minutos e os poços foram novamente lavados e submetidos à secagem. Em seguida, adicionou-se 200µl de álcool:acetona (80:20) e seguiu-se a leitura da densidade óptica. Para determinação do grau de aderência sob a ação do desinfetante foram utilizadas as equações descritas anteriormente para analisar a formação de biofilme.

E finalmente, para avaliar a ação dos desinfetantes sobre o biofilme consolidado, colônias de *Staphylococcus aureus* foram inoculadas em 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia ®) até turvação 0.5 na escala de McFarland e incubadas a 37°C/24h. Em seguida, 100µl da solução foram inoculados em placas de microdiluição e incubados a 37°C/24h. posteriormente, o conteúdo de cada poço foi aspirado e três lavagens com água destilada estéril foram realizadas. Após a secagem em temperatura ambiente foram adicionados 200µl do desinfetante e realizada uma primeira leitura da densidade óptica. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C/24h e realizou-se a segunda leitura. A DO dos poços foi determinada após a adição do desinfetante (0h) e 24 horas após incubação da placa a 37°C, sendo a ação do desinfetante no biofilme consolidado definida pela equação: $100 - [(DO_{24h} \text{ média} / DO_{0h} \text{ média}) \times 100]$ (MARINO *et al.*, 2010). Para o teste foram utilizados poços em triplicata contendo Caldo Triptona Soja como branco, cepa controle positivo e cepa controle negativo. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada por espectrofotometria a 620nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 86 isolados de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes analisados, 67,4% (58/86) e 16,3% (14/86), apresentaram capacidade de adesão quando expostos aos produtos à base de clorexidine e ácido láctico, respectivamente. Esses achados são inferiores aos encontrados por Peixoto *et al.* (2015), que observaram 87,5% (14/16) de adesão em isolados de *Staphylococcus spp.*, quando submetidos ao tratamento por clorexidine.

Foi evidenciada redução significativa da adesão de *S. aureus* em 94,2% (81/86) dos isolados submetidos ao clorexidine e 100% dos submetidos ao ácido láctico. E apesar dos produtos à base de clorexidine serem comumente utilizados na desinfecção dos tetos na rotina de ordenha há bastante tempo (MEDEIROS *et al.*, 2009; RAMALHO *et al.*, 2012), os

resultados encontrados nesse estudo foram favoráveis, o que sugere que esse produto esteja sendo utilizado de forma correta, respeitando o tempo de aplicação. Essa prática favorece a sua ação preventiva, já que o processo de adesão de *Staphylococcus spp.* é muito rápido, menos de três horas (MILLEZI *et al.*, 2012).

Observou-se elevada ação do ácido láctico no processo de adesão de biofilmes. Essa eficácia foi maior no grupo de microrganismos classificados como moderados formadores de biofilmes. Esse resultado é de grande importância, pois a utilização de ácido láctico foi observada em 80% das fazendas estudadas. Esse resultado satisfatório pode estar associado ao fato do ácido láctico não ser um desinfetante tão utilizado na rotina, quando comparado ao iodo e clorexidina (LOPES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013), e a não escolha pode ser decorrente desse desinfetante ser mais utilizado apenas para pré-dipping (SANTOS *et al.*, 2018). E isso, de certa forma, pode ser bastante favorável, visto que, por ser um produto pouco procurado, comparado aos demais desinfetantes habitualmente utilizados, e que servem tanto para o pré, como para o pós dipping, oferece uma melhor resposta na desinfecção do teto e eficácia contra a adesão de biofilmes.

A ação de desinfetantes sobre o biofilme de bactérias é um mecanismo que requer atenção, uma vez que podem surgir isolados bacterianos resistentes, fato que pode comprometer o uso desses agentes (VETAS *et al.*, 2017). E ao contrário do que se observou no biofilme em formação, o ácido láctico apresentou baixa eficácia sobre o biofilme já formado, com apenas 3,5% da taxa de redução, enquanto a clorexidina conseguiu reduzir 43% do biofilme consolidado.

Observou-se que *Staphylococcus aureus* na forma de biofilme consolidado foi mais resistente aos desinfetantes quando comparado ao momento de adesão. Sugere-se que essa resistência esteja associada ao baixo poder de penetração dos compostos desinfetantes no biofilme. Sabe-se que células em biofilmes são muito mais resistentes à desinfecção quando comparadas às células planctônicas (SILVA *et al.*, 2014), desta forma, muitos métodos convencionais de desinfecção são ineficientes contra biofilmes, sendo necessário, por vezes, doses elevadas. Outra forma de controle é a prática de ações que impeçam a formação desses biofilmes.

Sabe-se que tanto a clorexidina como o ácido láctico nas concentrações estudadas são eficazes contra células vegetativas de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, houve a recuperação de células viáveis após 24 horas de tratamento pelos desinfetantes nos biofilmes consolidados. Por outro lado, constatou-se que essas concentrações são capazes de inibir a adesão e formação de biofilmes. Esses resultados corroboram os de Peixoto *et al.* (2015) que observaram uma forte resistência de *Staphylococcus spp.* presentes no biofilme consolidado, com a recuperação de células viáveis após 24 horas de exposição de desinfetantes à base de clorexidina e iodo.

Muitos desinfetantes apresentam ação em suspensões microbianas, porém, sobre biomassas a atividade diminui muito, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento de formas de resistência por parte do biofilme (PEREIRA, 2001). Sendo assim, Tendo como base os dados observados nesse estudo e os resultados de Peixoto *et al.* (2015), pode-se associar essa resistência de *Staphylococcus aureus* no biofilme consolidado ao fator virulência, por ser um microrganismo comumente causador da mastite bovina, responsável pelos danos mais agressivos ao rebanho.

Esses resultados confirmam o elevado grau de resistência de *Staphylococcus aureus* quando presentes em biofilmes consolidados, e reflete a importância das práticas de ordenha voltadas à prevenção de casos de mastite e na utilização de desinfetantes adequados, que consigam atuar contra as células livres e biofilme formado. Na maioria dos casos a escolha do desinfetante a ser utilizado ocorre pelo baixo custo, praticidade na obtenção e facilidade de aplicação. Não se avalia a eficácia contra os patógenos em questão. É de fundamental

importância realizar uma avaliação periódica dos desinfetantes comumente usados em fazendas leiteiras, considerando também suas implicações para ocorrência de mastite por *S. aureus* no rebanho estudado. Além disso, observa-se a necessidade de práticas que visem a melhor eficiência nas práticas desinfecção dos tetos para agir impedindo a adesão de *Staphylococcus spp.* no teto e prevenir a consolidação de biofilmes e consequente dificuldade de remoção.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se com esse estudo que os produtos testados apresentaram elevada redução na taxa de adesão de todos os isolados. No entanto, a ação sobre os biofilmes consolidados foi mais significativa apenas para o produto à base de clorexidina. Percebe-se a necessidade da elaboração e utilização de desinfetantes que atuem tanto nos microrganismos isolados quanto em biofilmes. Além disso, existe a necessidade de programas mais rigorosos no manejo de ordenha para controlar a mastite e prevenir a adesão e formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; DA SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 565-573, 2016.
- AZIZOGLU, R. O.; LYMAN, R.; ANDERSON, K. L. Bovine *Staphylococcus aureus*: dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic susceptibility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 2, p. 993-999, 2013.
- BARLOW, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, p. 383-407, 2011.
- LOPES, L.; LACERDA, M.; RONDA, J. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2013.
- MARINO, A.; BELLINGHERI, V.; NOSTRO, A.; MICELI, N.; TAVIANO, M.F.; Guvenç, A.; BISIGNANO, G. In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 470-476, 2010.
- MARTINS, P. D.; ALMEIDA, T. T.; BASSO, A. P.; MOURA, T. M.; FRAZZON, J.; TONDO, E. C.; FRAZZON, P. G. Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 9, p. 771-776, 2013.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.
- MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.;

SOLANO, C. CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J. PENADES, J.R.; LASA, I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n.3, p. 832-843, 2009.

MILLEZI, F. M.; PEREIRA, M. O.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M. D. G.; PICCOLI, R. H. Susceptibility of monospecies and dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J. Food Safety**, v. 32, p. 351-359, 2012.

PEIXOTO, M. M. R.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus spp*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 105-109, 2015.

PEREIRA, M. O. P. O. Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme. 2001. 234 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2001.

RAMALHO, A. C.; SOARES, K. D. A.; SILVA, D. F.; BARROS, M. R. C.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; OLIVEIRA, J. M. B.; MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus spp*. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; TAGLIARI, V. Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V. P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p.1082-1085, 2010.

SANTOS, P. S.; SOUZA, F. N.; VASCONCELOS, C. G. C.; ROSA, D.L.S.O.; JARDIM, A. B.; CUNHA, A. F.; LANA, M. B. H.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Eficácia in vitro de antissépticos utilizados no controle da mastite bovina frente a isolados de *Staphylococcus aureus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 1997-2002, 2016.

SANTOS, I. C.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. F. ; OLIVEIRA, V. R. ; MARTINS, L. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados no pré-dipping frente a amostras de *Staphylococcus spp*. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, n. 1, 2018.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to 381 development of the California mastitis test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, p. 199-204, 1957.

SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; KUNG, E. S.; NASCIMENTO, R. B.; FERNANDES, M. S. T. F.; BEZERRA, M. J. G.; SÁ, S. G.; RIBEIRO, M. N.; MOTA, R. A. Etiologia das Mastites em Cabras e Ovelhas de Raças Naturalizadas Criadas no Semiárido Nordeste. **Medicina Veterinária**, v. 7, p. 26-31, 2013.

SILVA, E. E. R.; DILVA JÚNIOR, J. C. P.; RÊGO, M. B. L.; BORGES, S. M. C. Biofilmes microbianos e suas implicações na saúde pública. **Revista Meio Norte de Medicina Laboratorial**, v. 1, n.1, 2014.