

Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em condições de biofilme

Susceptibility and resistance to antimicrobial Staphylococcus aureus under biofilm

Laura Gonçalves da Silva CHAGAS¹; Poliana de Castro MELO²; Anna Monteiro Correia LIMA³; Gabriela Bim RAMOS¹; Denise von Dolinger de Brito RÖDER⁴; Antônio NADER-FILHO⁵

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil

² Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA, Brasil

³ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia – MG, Brasil

⁴ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Uberlândia – MG, Brasil

⁵ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal – SP, Brasil

Resumo

Os *Staphylococcus*, principais agentes causadores da mastite, quando em biofilmes, estão relacionados a uma série de mecanismos de resistência em diferentes tipos de infecções. O presente trabalho avaliou a susceptibilidade e resistência dos *Staphylococcus aureus*, isolados de casos de mastite bovina e do ambiente de ordenha, em condições de biofilme, frente a três antimicrobianos distintos em diferentes concentrações. Foram utilizadas trinta e duas estirpes de *S. aureus* testadas frente aos testes de inibição da concentração mínima de erradicação de biofilmes, utilizando cefalexina, amoxicilina e rifampicina, nas concentrações de 30 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL, por doze horas de contato, e a eficiência dos testes avaliada pela contagem das unidades formadoras de colônias e pelo teste de microplacas. Os resultados revelaram que, entre os antimicrobianos testados, a cefalexina foi o que apresentou melhor eficiência nas três concentrações testadas, e a rifampicina e amoxicilina tiveram maior eficiência nas concentrações de 50 e 100 mg/mL. Esses dados demonstram a importância sobre antibioticoterapia orientada associada com a correta higienização dos equipamentos de ordenha, evitando-se, assim, a formação de biofilmes, a adesão microbiana persistente em equipamentos, e a difusão dos microrganismos pelo canal ascendente dos tetos entre os animais do rebanho.

Palavras-chave: Mastite. Microrganismos. Terapia antimicrobiana. Resistência microbiana.

Abstract

Staphylococcus is an important agent of mastitis, especially when biofilm producers are related to a number of mechanisms of resistance to different types of infections. The objective of this research was to evaluate the susceptibility and resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolates from cases of bovine mastitis and milking environment under conditions of biofilm, compared to three different concentrations in different antimicrobials. Thirty-two strains used were *S. aureus* that, due to the inhibition tests, minimal biofilm eradication concentration were tested using cephalixin, amoxicillin and rifampin at concentrations of 30 mg/mL, and 50 mg/mL 100 mg/mL for 12 hours, and efficiency of tests evaluated by counting the colony forming units and the microplate test. The results revealed that among the tested antibiotics cephalixin showed the best efficiency at the three concentrations tested, and rifampin and amoxicillin were more efficient at concentrations of 50 and 100 mg/mL. These data demonstrate the importance of targeted antibiotic therapy associated with the correct cleaning of milking equipment, thus, preventing the formation of biofilm, avoiding persistent microbial adhesion in equipment, and the spread of microorganisms by ascending channel teats among herd animals.

Keywords: Mastitis. Microorganisms. Antimicrobial therapy. Microbial resistance.

Introdução

A mastite bovina é uma doença que causa grande impacto econômico aos produtores pela redução da produção de leite. A diversidade de agentes etiológicos, a resistência antimicrobiana, e dificuldade de controle dos microrganismos contaminantes e am-

Correspondência para:

Laura Gonçalves da Silva Chagas
Laboratório de Doenças Infectocontagiosas/FAMEV/UFU
Av. Ceará s/nº, Bloco 2D – Sala 33 – Campus Umuarama
CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil
e-mail: lauravetufu@gmail.com

Recebido: 08/02/2014

Aprovado: 22/07/2015

bientais dificultam o tratamento do animal (COSTA et al., 2013). *Staphylococcus aureus* é o maior causador dessa doença, e alguns estudos mostraram que uma das dificuldades de destruição desta bactéria é que existem estirpes que podem formar biofilmes.

O biofilme é um biopolímero composto por agentes de uma mesma espécie, gênero ou não, e pode ser diversificado entre bactérias, vírus, protozoário, microalgas e fungos, os quais devem estar aderidos entre si e que, em condições ideais de temperatura, pH, fatores nutricionais e fluídos hidrodinâmicos, são capazes de produzir uma matriz de constituição polissacarídica (CLUTTERBUCK et al., 2007).

Cos et al. (2010) relataram que, na medicina humana, os biofilmes são envolvidos em infecções bacterianas como fibrose cística, endocardite, otite média crônica, prostatite, peritonite e infecções de feridas. Já na medicina veterinária, eles têm sido associados a casos de mastite bovina (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006). Baselga et al. (1993) sugeriram que as estirpes produtoras de biofilme de *S. aureus* apresentaram maior capacidade para fixação em superfícies e mucosas mamárias e que possuem maior potencial de infecção do que as bactérias não produtoras de biofilmes.

As infecções causadas por biofilmes raramente são dribladas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, mesmo nos animais que apresentam uma excelente resposta imune humoral e celular. As células bacterianas sésseis liberam antígenos que estimulam a produção de anticorpos, mas que não conseguem eliminar as bactérias incluídas em biofilmes e podem causar danos aos tecidos circundantes (BALDASSARRI et al., 2001). A antibioticoterapia normalmente reverte os sinais clínicos causados por células planctônicas liberadas do biofilme, mas não consegue destruí-lo (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). Por essa razão, após ciclos de terapia com antibióticos, as infecções podem apresentar um comportamento recorrente, até que a população sésil seja removida cirurgicamente do local de infecção (HEILMANN, 2003).

Entre os mecanismos utilizados pelos biofilmes para resistir à penetração dos antimicrobianos, estão incluídos o aumento da liberação de proteases, mudanças na proteína de membrana de bactérias, os lipolissacarídeos (LPS). Tais estratégias resultam na resistência aos antibióticos, fazendo com que a doença passe da fase aguda para crônica (MASADEH et al., 2013). As variações genéticas, taxas de mutação, seleção natural dos microrganismos durante o desenvolvimento do biofilme (TYERMAN et al., 2013), a utilização das concentrações de antibióticos em dose subinibitórias dão origem a uma seleção de resistência a drogas, além do aumento da regulação das bombas de efluxo e o aparecimento de resistências cruzadas entre desinfetantes e antibióticos (GILBERT; ALLISON; McBAIN, 2002; GILBERT; McBAIN; RICKARD, 2003).

A resistência de biofilmes bacterianos em altas concentrações de antimicrobianos tem sido uma causa de tratamentos ineficazes de doenças crônicas e, portanto, torna-se de grande importância a compreensão das vias de regulação do biofilme, bem como da ação dos antimicrobianos e biocidas, para que possa ser desenvolvida uma terapia antibiofilme bem-sucedida.

O presente trabalho foi delineado para investigar a ação dos antimicrobianos amoxicilina, rifampicina e cefalexina, após doze horas de contato em diferentes concentrações, em biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina e do ambiente de ordenha.

Material e Métodos

Isolados Bacterianos

Foram avaliadas 29 estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite em casos de mastite bovina e três isoladas de insufladores, localizados no ambiente de ordenha. Todos os isolados foram obtidos em uma mesma fazenda localizada na região de Indianópolis, Minas Gerais, e todos foram susceptíveis aos antimicrobianos na forma não aderida, para que pudessem, então, ser selecionados para os testes em biofilmes. Os

testes para identificação das amostras foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia e no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, de Jaboticabal.

Concentração mínima inibitória para erradicação de biofilmes

No Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia, foi realizado o cultivo de biofilme *in vitro* e adicionados os antimicrobianos em diversas diluições, para realizar os testes fenotípicos de contagem de unidades formadoras de biofilme e quantificação da biomassa de biofilme. Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas por amostra e por diluição do antibiótico, e repetidos duas vezes. Todos foram pareados com controle positivo, a amostra testada sem o antimicrobiano (AMORENA et al., 1999).

O volume 1 µL da cultura bacteriana em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) incubado em aerobiose a 37°C, durante 18 horas, foi adicionado a 199 µL de BHI suplementado com 2% de glicose, em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços em fundo plano. As microplacas foram incubadas para formação de biofilmes por 24 horas a 37°C em aerobiose, com o meio renovado após 12 horas de cultivo. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de solução salina estéril, para remover as bactérias que não aderiram. A seguir, foram adicionados 200 µL de diluição de antibióticos amoxicilina, rifampicina e cefalexina em BHI nas concentrações de 30 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL, por um período de 12 horas (AMORENA et al., 1999).

Contagem de unidades formadoras de colônias nos biofilmes

As placas foram lavadas com solução salina estéril a 0,85% duas vezes. Em seguida, adicionados 200 µL dessa solução em cada poço para o procedimento de

raspagem do biofilme com ponteiros de 200 µL. A solução raspada, em triplicata por estirpe, foi sonicada durante 20 segundos numa amplitude de 22%. Após a sonicação, as estirpes foram submetidas a um vórtex para homogeneização. Foram realizadas diluições seriadas e adicionadas três gotas de 10 µL a cada uma delas em ágar Triptycase Soy Agar (TSA), método de gotejamento, e incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas. Logo após, foi realizada a contagem das colônias existentes em cada placa e realizado o cálculo para as diluições expressas em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (GOMES, 2010).

Determinação da biomassa do biofilme

A capacidade de produção de biofilmes “in vitro” foi determinada de acordo com Cucarella et al. (2001), com modificações. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de solução salina estéril, incubados em estufa com temperatura de 60°C, durante 15 minutos para secagem. Adicionaram-se, então, 200 µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada, e quando secas, foram adicionados 200 µL de ácido acético a 33%, para posterior leitura a 570 nm no leitor de Elisa (Thermo plate). Os poços não inoculados contendo BHI com glicose foram considerados brancos para controle da reação, sendo então, consideradas produtoras de biofilmes as estirpes com absorvância maior que 0,1 (MACK et al., 2000).

Resultados e Discussão

No teste de determinação da biomassa do biofilme de *Staphylococcus aureus*, foram consideradas as amostras resistentes que formaram um biofilme com absorvância maior que 1,000 de acordo com a tabela 1. Os resultados revelaram que, entre os três antimicrobianos testados, os mais eficientes foram a cefalexina nas três concentrações, e a amoxicilina e rifampicina na concentração de 100 mg/mL. Quanto à avaliação da biomassa, após o contato de 12 horas com os referidos antimicrobianos, a cefalexina apresentou melho-

res resultados nas concentrações de 30 mg, entretanto, houve três estirpes resistentes na concentração de 50 mg e nove estirpes resistentes na concentração de 100 mg. Isso ocorre pela alta concentração da cefalexina, o que dificulta a penetração do antimicrobiano pela matriz do biofilme.

Tabela 1 – Concentração dos antibióticos amoxicilina, cefalexina e rifampicina na dosagem de 30mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL no teste de determinação de biomassa do biofilme de *Staphylococcus aureus* – Uberlândia – 2013

Dosagem	Número de amostras resistentes		
	Amoxicilina	Cefalexina	Rifampicina
30 mg	7	0	20
50 mg	7	3	11
100 mg	0	9	1

Em relação à avaliação da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), foi observado crescimento de colônias somente nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} . Houve maior resistência das estirpes na concentração de 30 mg para o efeito da amoxicilina e rifampicina, e na dosagem de 50 mg para cefalexina e rifampicina. Esse efeito pode estar relacionado com a capacidade de resistência que as estirpes apresentam quando em biofilme, além da barreira física de polissacarídeos que protegem os microrganismos e impedem a difusão eficiente destes antimicrobianos (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de contagem de unidades formadoras de colônias para biofilmes de *Staphylococcus aureus* na diluição 10^{-2} , dos antimicrobianos amoxicilina, cefalexina e rifampicina na dosagem de 30 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL – Uberlândia – 2013

Dosagem	Número de amostras resistentes		
	Amoxicilina	Cefalexina	Rifampicina
30 mg	14	2	8
50 mg	4	12	26
100 mg	8	9	11

Amorena et al. (1999) avaliaram quatro estirpes de *S. aureus* em biofilmes (6 e 48 horas) frente a 11 an-

timicrobianos nas concentrações de 100 mg/L e 500 mg/L por um período de 6 e 24 horas. Observaram que a rifampicina, vancomicina, cefuroxime, fosfomicina, novobiocina, penicilina, ciprofloxacina, tobramicina e cefazolina interferiram na viabilidade das células microbianas. A gentamicina e eritromicina não apresentaram efeito significativo nas estirpes. Alguns antibióticos apresentaram baixa eficiência quando nas concentrações 100 mg/mL, devido à baixa difusão pela matriz. No presente trabalho, foram utilizadas dosagens mais concentradas que do estudo de Amorena et al. (1999), por causa da resistência das estirpes testadas em forma de biofilme, e mesmo assim houve amostras resistentes.

Anwar, Strap e Costerton (1992) observaram o efeito de 70 µg/ml de tobramicina e 500 µg/ml de cefalexina em biofilmes de *S. aureus* formados por dois e 21 dias. Ao analisarem a quantidade de células viáveis sésseis do biofilme e planctônicas após seis horas do contato com o antibiótico, notaram que a redução das células planctônicas foi maior do que em forma de biofilme, sendo que o biofilme de 21 dias teve uma redução menor quando comparado ao de dois dias. Diferente desse estudo, no presente trabalho, foi utilizado um intervalo de 12 horas em contato com o antibiótico para destruir o biofilme de 24 horas, a fim de auxiliar na avaliação de um intervalo e na dose ideal, para melhor desempenho do antibiótico contra células de biofilme.

Todas as estirpes, também quando testadas na forma não aderida, apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos, mas quando testadas em biofilme esta susceptibilidade alterou-se de acordo com a concentração e o antimicrobiano testado, ressaltando a importância da não utilização indiscriminada dos antimicrobianos na medicina veterinária. Cada vez mais, o teste simples de antibiograma não funcionará adequadamente quando for realizado apenas com as bactérias em sua forma livre, isolada, pois, na atualidade, grande parte das infecções é causada por bactérias produtoras de biofilmes (CLUTTERBUCK et al., 2007).

A utilização combinada de agentes bactericidas contra biofilme não significa um efeito maior na destruição do biofilme, como foi avaliado por Leite et al. (2013), que estudaram o efeito do antibiótico linezolida e o agente mucolítico N-acetilcisteína (NAC) separados e em combinação frente a *Staphylococcus epidermidis* em condições de biofilme. Observaram que, quando testada sozinha, a NAC teve efeito biocida frente aos microrganismos em biofilme, porém quando testada em sinergismo com a linezolida, o efeito biocida levou a uma redução de cinco vezes em concentração logarítmica a quantidade de microrganismos. Sendo assim, a pesquisa do antimicrobiano ideal para destruição do biofilme torna-se essencial para ter uma terapia eficaz.

No presente trabalho, o efeito da cefalexina apresentou bons resultados, pois foi utilizada isoladamente em concentrações mais baixas nas condições de biofilme por *S. aureus* quando comparada aos outros dois antimicrobianos testados, revelando-se como um antimicrobiano indicado para o tratamento de mastite. Além disso, ainda são poucos os trabalhos que relatam o efeito de antimicrobianos contra os microrganismos em condições de biofilme.

Sendo assim, é importante não só a avaliação correta da melhor antibioticoterapia, mas também das

condições de higiene do ambiente, evitando-se que as bactérias presentes em ambientes com falhas na higienização não retornem ao animal que já passou por um tratamento. A combinação de limpeza e sanitização adequadas com antibioticoterapia orientada por ensaios laboratoriais é a melhor opção, principalmente quando a questão de resistência dos microrganismos em biofilmes frente aos agentes sanitizantes foi comprovada por diversos autores (MELO, 2011).

Conclui-se que, em condições de biofilme, houve uma variação da eficiência da cefalexina, amoxicilina e rifampicina, sendo a cefalexina o antimicrobiano que apresentou maior ação biocida nas três concentrações testadas. Diante disso recomenda-se uma orientação quanto à utilização dos antimicrobianos nas diferentes infecções causadas pelos *S. aureus*, principalmente nas infecções recorrentes, devendo ser levadas em consideração as condições de formação de biofilmes pelos microrganismos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

- AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J. L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 43-55, 1999. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/44/1/43.abstract>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/44.1.43>
- ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalixin and tobramycin in a chemostat system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 890-893, 1992. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/36/4/890.long>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: [10.1128/AAC.36.4.890](https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.890)
- BALDASSARRI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M. G.; IOSI, F.; ARCIOLA, C. R.; MONTANARO, L.; DI ROSA, R.; GHERARDI, G.; DICUONZO, G.; OREFICI, G.; CRETI, R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 3, p. 113-120, 2001.
- BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4857-4862, 1993.
- CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 1-17, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350600527X>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.029>.
- COS, P.; TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; MAES, L. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 20, p. 2279-2295, 2010. Disponível em: <<http://beta.eurekaselect.com/72103/article>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138161210791792868>.
- COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v80n3/06.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572013000300006>.
- CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, 2001. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/183/9/2888>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>.
- 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. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/content/42/8/872>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.
- GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; McBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 98S-110S, 2002. Supplement S1. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x.abstract>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x>.
- GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 245-248, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483050300043X>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00043-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00043-X).
- GOMES, F. **Novas estratégias terapêuticas contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis***. 2010. 134 f. Tese (Doutorado) – Universidade do Minho, Braga, 2010.
- HEILMANN, C. Molecular basis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. In: WILSON, M.; DEVINE, D. **Medical Implications of Biofilms**. New York: Cambridge University Press, 2003. p. 110-135. Disponível em: <<http://ebooks.cambridge.org/chapter.jsf?bid=CBO9780511546297&cid=CBO9780511546297A015&tabName=Chapter>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511546297.007>.
- LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; SOUZA, C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 10, p. 655-659, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X12004338>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.011>.
- MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K. M.; ELSNER, H. A.; FEUCHT, H. H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 3799-3807, 2000. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/68/7/3799>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.7.3799-3807.2000>.
- MASADEH, M. M.; MHAI DAT, N. M.; ALZOUBI, K. H.; HUSSEIN, E. I.; AL-TRAD, E. I. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. **Infection and Drug Resistance**, v. 6, p. 27-32, 2013. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/in-vitro-determination-of-the-antibiotic-susceptibility-of-biofilm-for-peer-reviewed-article-IDR>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S41501>.
- MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? Review. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398-407, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023305000316>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006>.
- MELO, P. C. **Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina**. 2011. 140 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.
- TYERMAN, J. G.; PONCIANO, J. M.; JOYCE, P.; FORNEY, L. J.; HARMON, L. J. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 22, p. 1-7, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/13/22>>. Acesso em: 11 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-22>