



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e perfil de resistência frente a desinfetantes

Recife, PE

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e perfil de resistência frente a desinfetantes

Tese apresentada ao programa de Biociência animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Elizabeth S. de Medeiros

Co-orientador: Luís Augusto Nero

Recife, PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S676p Soares, Karla Danielle Almeida.
Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e perfil de resistência frente a desinfetantes / Karla Danielle Almeida Soares. – Recife, 2019.
76 f.: il.

Orientador(a): Elizabeth Sampaio de Medeiros.
Coorientador(a): Luis Augusto Nero.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Staphylococcus aureus 2. Biofilmes 3. Resistência
I. Medeiros, Elizabeth Sampaio de, orient. II. Nero, Luis Augusto, coorient. III. Título

CDD 574

KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES

Pesquisa de *Staphylococcus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e perfil de resistência frente à desinfetantes.

Tese defendida e aprovada em ___/___/_____.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Programa de Pós Graduação em Biociência Animal-UFRPE
Presidente

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Betânia de Queiroz Rolim
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. Julicelly Gomes Barbosa
Universidade Federal de Alagoas

Dedico essa conquista a Deus, meus pais e irmãos,
que sempre foram fonte de motivação, me deram
força e fizeram com que cada esforço fosse válido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais uma conquista, por permitir que eu perseverasse mesmo com todos os problemas e dificuldades encontrados pelo caminho. Por me manter fortalecida na fé e inabalável aos obstáculos.

Aos meus pais Milton e Girlene, por serem minha base e fortaleza, por acreditarem no meu potencial e por serem os grandes incentivadores e apoiadores. Por serem os mais fiéis torcedores e minha fonte de conselhos nos momentos de angústia. Por serem minha principal referência pessoal e profissional, exemplo de vida, honestidade e caráter. Vocês são meu amor maior! A vocês todo o meu amor, gratidão e admiração!

Aos meus irmãos Kaká e Danilo por todo amor que ofertam, por vibrarem comigo a cada conquista, pelo apoio, carinho e motivação.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou, avós, avôs (in memoriam) tios, tias, cunhada e primos, por todo o amor e carinho.

À professora Elizabeth Sampaio pela orientação, confiança, por acreditar e não desistir de mim, e acima de tudo pela paciência, amizade e carinho.

Ao Professor Luis Nero, por ter me acolhido e viabilizado a execução do experimento na UFV. Agradeço também à querida Emilene, que mesmo estando prestes a parir, foi extremamente prestativa e me passou todos os protocolos que iria utilizar.

À minha querida amiga Cibeli Viana por ter sido a ponte que me levou à UFV, o que proporcionou uma fase enriquecedora de crescimento profissional e pessoal. À todos do laboratório de inspeção, muito obrigada por cada dia de aprendizado e companheirismo vivido.

Às minhas companheiras de laboratório da UFRPE, pela troca de experiências, companhia e ajuda.

À empresa Lactalis, por fornecer o contato das fazendas que foram objetos de estudo. À cada produtor, pela receptividade, simplicidade e acolhimento. Aos queridos amigos que ajudaram em todas as etapas. À todas as vacas que foram inseridas nesse estudo, pois sem elas o experimento não seria possível.

À professora Chiara, pela paciência, colaboração e grande contribuição.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo

A produção leiteira no Brasil se destaca por ser uma das atividades mais importantes para pecuária brasileira, sendo responsável pela fonte de renda de milhões de brasileiros. Entretanto, essa atividade é constantemente influenciada pela ocorrência da mastite, principalmente na forma subclínica, que ocorre nos rebanhos. *Staphylococcus* spp constitui o principal gênero de bactérias causadoras de mastite em bovinos. Objetivou-se com este estudo pesquisar *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e traçar o perfil de resistência frente à desinfetantes. Foram selecionadas 10 fazendas vinculadas à uma Usina de beneficiamento de leite sob registro federal. 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 960 animais para o exame microbiológico após antissepsia do óstio dos tetos com álcool 70°GL. 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. Posteriormente, 213 isolados *Staphylococcus* spp. classificados como fortes e moderados produtores de biofilmes foram selecionados para caracterização quanto ao perfil fenotípico e presença do gene femA para identificação de *S. aureus*. Destes, foram confirmados 152 isolados, que foram submetidos a detecção de genes capazes de produzir biofilmes (*icaA*, *icaD* e *Bap*), genes que codificam as enterotoxinas (*SeA*, *SeB*, *SeC*, *SeD*, *SeE*), e genes relacionados a resistência (*Tet(k)*, *Vana*). Testou-se a ação de desinfetantes (clorexidine e ácido láctico) utilizados na rotina de ordenha sobre o biofilme em formação e consolidado em 86 destas amostras. Em 84,16% (134/152) das amostras foram constatados o gene BAP, em 78,29% (119/152) o gene *IcaD* e, em apenas 1,32% (2/152) o gene *IcaA*. Apenas as enterotoxinas *Sec* em 17,76% (27/152) das amostras e *See* em 0,66% (1/152). Foram encontrados genes de resistência *TetK* em 48,68% (74/152) das amostras. Observou-se resultado satisfatório dos dois desinfetantes testados sobre o biofilme em formação, em 94,2% (81/86) dos isolados submetidos ao clorexidine e 100% dos submetidos ao ácido láctico. Entretanto, para o biofilme consolidado o percentual de ação foi bem inferior, o ácido láctico apresentou baixa eficácia sobre o biofilme já formado, com apenas 3,5% da taxa de redução, enquanto a clorexidine conseguiu reduzir 43% do biofilme consolidado. O efeito dos desinfetantes na redução da adesão de biofilmes foi

bastante significativo. Sugere-se a investigação de produtos mais eficazes, que atuem tanto nas células bacterianas livres, como nos microrganismos na forma de biofilmes.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, biofilmes, desinfetantes, resistência.

Abstract

Dairy production in Brazil stands out as one of the most important activities for Brazilian livestock, being responsible for the source of income of millions of Brazilians. However, this activity is constantly influenced by the occurrence of mastitis, especially in the subclinical form, which occurs in herds. *Staphylococcus* spp is the main genus of mastitis-causing bacteria in cattle. The aim of this study was to investigate enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* biofilm-forming isolates from bovine mastitis in dairy herds and to profile resistance against disinfectants. Ten farms linked to a federally registered Milk Processing power plant were selected. Physical examination of the mammary gland and milk of the animals was performed and then the California Mastitis Test. Samples were collected from 960 animals for microbiological examination after antiseptics of the roof ostium with 70 ° GL alcohol. In the laboratory, aliquots of 10 µl of milk were seeded on 5% sheep blood agar and then plates incubated at 37 ° C for 48 hours. Subsequently, 213 isolates *Staphylococcus* spp. classified as strong and moderate biofilm producers were selected for characterization regarding the phenotypic profile and presence of the femA gene for identification of *S. aureus*. Of these, 152 isolates were confirmed, which were subjected to detection of genes capable of producing biofilms (*icaA*, *icaD* and *Bap*), genes encoding enterotoxins (*SeA*, *SeB*, *SeC*, *SeD*, *SeE*), and resistance related genes (*Tet (k)*, *Vana*). The action of disinfectants (chlorhexidine and lactic acid) used in the milking routine on biofilm in formation and consolidated in 86 of these samples was tested. In 84.16% (134/152) of the samples the BAP gene was found, in 78.29% (119/152) the *IcaD* gene and in only 1.32% (2/152) the *IcaA* gene. Only enterotoxins *Sec* in 17.76% (27/152) of the samples and *See* in 0.66% (1/152). *TetK* resistance genes were found in 48.68% (74/152) of the samples. Satisfactory results were observed for the two disinfectants tested on the biofilm in formation, in 94.2% (81/86) of chlorhexidine isolates and 100% of lactic acid isolates. However, for the consolidated biofilm the action percentage was much lower, the lactic acid showed low efficacy over the already formed biofilm, with only 3.5% of reduction rate, while chlorhexidine was able to reduce 43% of the consolidated biofilm. The effect of disinfectants on reducing biofilm adhesion was quite significant. Research into more effective products that act on both free bacterial cells and microorganisms in the form of biofilms is suggested.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilms, disinfectants, resistance.

Sumário

1.	Introdução	09
2.	Revisão de Literatura	11
	2.1 Produção leiteira	11
	2.2 Mastite bovina	12
	2.3 <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	16
	2.4 Enterotoxinas Estafilocócicas	18
	2.5 Biofilmes	20
	2.6 Desinfetantes utilizados no pré e pós dipping	24
	2.7 Resistência aos antimicrobianos	27
3.	Objetivos	31
4.	Referências	32
5.	Artigo 1	45
6.	Artigo 2	60
7.	Considerações Finais	76

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária, é uma afecção multifatorial, que constitui um fator de grande impacto na produção leiteira. Trata-se de uma enfermidade que possui complexa relação entre o hospedeiro, ambiente e agentes infecciosos, fatores determinantes para sua ocorrência. Esse processo inflamatório pode ser classificado, conforme a sua manifestação, como mastite clínica e subclínica (MARTINS et al., 2010).

Embora, possa ser causada por inúmeros patógenos, *Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos agentes etiológicos mais frequentes da mastite bovina, que causa os maiores prejuízos econômicos à pecuária leiteira brasileira (COSTA et al., 2013).

Neste contexto, *Staphylococcus aureus* são reconhecidamente a causa mais frequente de infecções associadas a biofilmes, estruturas constituídas por células aderentes a uma superfície, embebidas numa matriz de exopolissacarídeo (KASNOWSKI et al., 2010), que podem dificultar a eliminação de microrganismos indesejáveis (SALIMENA, 2014).

Em condições ambientais favoráveis os microrganismos se aderem, interagem com diversas superfícies e iniciam o crescimento celular, sendo então formado o biofilme. Essa adesão depende da fisiologia do microrganismo e seus fatores de crescimento e da natureza do substrato. Esses podem ser caracterizados como comunidades microbianas constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas em superfícies embebidas numa matriz de polímeros extracelulares (Exopolissacarídeos - EPS) (SALIMENA, 2014). O desenvolvimento do biofilme começa com a aderência inicial (reversível e posteriormente irreversível) a uma superfície, com a ativação de genes envolvidos na expressão da proteína de aderência, de superfície e de produção de exopolissacarídeo (EPS) (NGUEYEN et al., 2012).

A habilidade de certas espécies de *Staphylococcus* spp. se aderirem à superfície do epitélio da glândula mamária está associada à produção de biofilmes, compostos de multicamadas de células embebidas em uma matriz (MELO et al., 2012).

Outro perigo relacionado a presença de um número elevado de *Staphylococcus* spp. no leite, ocorre devido à capacidade de produção de enterotoxina por esses

microrganismos, por se tratar de uma toxina resistente à altas temperaturas, oferece perigo potencial para a saúde pública (GUIDO et al., 2010). Segundo Bergdoll e Wong (2006), o grupo mais comum de enterotoxinas, que são responsáveis por 95% das intoxicações estafilocócicas é formado por cinco sorotipos (SEA, SEB, SEC, SED e SEE). Essas enterotoxinas são solúveis em água e altamente resistentes à atividade das maiorias das enzimas proteolíticas, tais como tripsina e pepsina o que mantém sua atividade biológica no tubo digestivo após ingestão (CRETENET et al., 2011).

O maior desafio para a cadeia de alimentos, é a resistência de biofilmes aos diferentes agentes antimicrobianos. Vários fatores podem explicar essa resistência: bactérias em biofilmes, particularmente aquelas presentes nas camadas mais internas, apresentam reduzidas taxas metabólicas e de crescimento; a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme; adicionalmente, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode reduzir fisicamente a penetração do agente antimicrobiano; e células em biofilme são fisiologicamente distintas de células planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo e regulons (GILBERT et al., 2002).

Nesse contexto as mastites, ocasionam efeitos que são amplamente conhecidos, como a destruição do parênquima mamário, resultando em perda funcional do tecido secretor, bem como redução da qualidade do leite e de seus derivados. No caso da mastite subclínica, o grande problema são os prejuízos pela diminuição da produção ao nível de propriedade e do rendimento da produção na indústria de laticínios (LANGONI et al., 2017). Segundo Conteras e Rodriguez (2011), *Staphylococcus aureus*, o principal patógeno dessas mastites, possui prevalência variando entre 81 a 94% dos casos desta enfermidade. Objetivou-se com esse estudo, pesquisar *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e traçar o perfil de resistência frente à desinfetantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção leiteira

Por ser um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira, o leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (HEMME e OTTE, 2010).

A produção leiteira brasileira é baixa em comparação a outras grandes nações que ocupam os primeiros lugares do *ranking* de produção, onde, por exemplo, os Estados Unidos da América conseguem obter 7.953 litros de leite por vaca/ano, enquanto que no Brasil a média alcançada é de 1.154 litros vaca/ano (JUNG, 2017).

Segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional em 2017 apresentou um crescimento significativo comparado aos dois anos anteriores. E a tendência é de um crescimento ainda maior nos próximos anos, só no primeiro trimestre de 2018, a aquisição de leite foi de 6.002,369 litros. Maior parte desse leite é oriundo da região sudeste, responsável por 40,52% da produção nacional. A região nordeste ocupa o 4º lugar, com apenas 5,54% da produção, nesta região o estado que mais produz é a Bahia, seguido do Ceará e Pernambuco, o estado de Alagoas ocupa a 7º posição neste *ranking* (IBGE, 2018).

Aumentar a eficiência de produção é um desafio constante na bovinocultura leiteira, por ser uma atividade de investimento alto e pequena margem de lucro (SANTOS et al., 2010).

A atividade leiteira passou por crescentes transformações, a presença da tecnologia elevou a competitividade do setor. Porém, pode-se considerar que tais transformações de maneira efetiva, ocorreram somente após forte impulso em termos de produtividade, principalmente em função da maior abertura de mercado e da inserção de novas tecnologias na cadeia, não somente na produção, mas também em termos de armazenamento, comercialização e distribuição do produto ao consumidor final (PACHECO et al., 2012).

Com esses impulsos, a produção de leite no Brasil passou a apresentar bons índices econômicos, no entanto, ainda persistem alguns entraves, principalmente relacionados à qualidade do leite produzido (ACOSTA et al., 2016). O leite produzido no país possui condições insatisfatórias, trata-se de um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática

estão envolvidos, e que não têm merecido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (ZENI et al. 2013).

Para Acosta et al. (2016), a qualidade e quantidade do leite produzido no país é influenciada por diversos fatores, como aquisição, armazenamento, transporte e fatores zootécnicos (manejo, alimentação e potencial genético dos rebanhos), além dos fatores relacionados ao animal e a glândula mamária.

Nesse sentido, um grande problema que interfere diretamente na qualidade desse produto e vem comprometendo a sanidade do rebanho e como consequência diminui o quantitativo de produtividade é a mastite. Essa enfermidade se comporta como um desafio na atividade leiteira pelas grandes perdas que ocasiona. A redução da produção de leite ocorre devido à lesão das células epiteliais secretoras da glândula mamária afetada, e consequente diminuição da produção e secreção do leite no quarto como um todo. O aumento da permeabilidade vascular também provoca diminuição da quantidade de leite produzido por passagem da água para o compartimento vascular (AIRES, 2010).

Segundo Lopes et al. (2013), existe uma grande pressão da sociedade para melhorar a qualidade do leite de modo geral e sem antibióticos. De tal forma, que pelo grande poder de persuasão dos consumidores sobre a indústria e sobre os derivados, foi aprovado em 2018, a Instrução Normativa nº76 e nº77 (BRASIL, 2018) para melhoria na qualidade do leite produzido no Brasil.

2.2 MASTITE BOVINA

As mastites continuam sendo um dos principais problemas sanitários nos animais destinados à produção de leite. De múltipla etiologia e de ocorrência mundial, sua prevalência está relacionada com o manejo sanitário dos animais e da ordenha. Especificamente na mastite bovina pode-se afirmar, que se trata de um entrave para a pecuária leiteira, repercutindo negativamente no que se refere à qualidade do leite, além de prejuízos econômicos e problemas de saúde pública (LANGONI et al., 2017).

O impacto decorrente da mastite se deve ao grande prejuízo causado ao produtor, uma vez que há redução da produção de leite, assim como seu descarte, à redução do valor comercial desses animais, abate precipitado, perdas na evolução

genética do rebanho e gastos com medicamentos, serviços veterinários e mão de obra extra (GOMES e HENRIQUES, 2016).

Além disso, a doença também causa prejuízos à indústria de laticínios devido a alterações na composição físico-química do leite, e ainda constitui ameaça à saúde dos consumidores devido à veiculação de patógenos e suas toxinas, ou pela presença de resíduos de antibióticos no leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Na mastite, o úbere se torna inflamado, pois microrganismos invadem o canal do teto e glândula mamária. Estes, se multiplicam, causam lesão no tecido secretor de leite, produzem toxinas, e ocasionam trauma e irritação proveniente de agentes químicos. Isso causa um aumento no número de leucócitos, ou células somáticas no leite, reduzindo sua quantidade e afetando negativamente a qualidade do leite e dos subprodutos (KULKARNI e KALIWAL, 2013).

A mastite, inflamação da glândula mamária, pode ser classificada em duas formas: clínica e subclínica. Na forma clínica, ocorrem alterações macroscópicas do leite, com flocos de pus e leite com aspecto mais aquoso, além dos sinais clínicos típicos de inflamação que podem ser observados. A mastite subclínica apresenta prevalência elevada, sendo a responsável pelas maiores perdas na indústria leiteira (ACOSTA et al., 2016).

Caracteriza-se por apresentar alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e na concentração dos teores de sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (SÁ et al., 2018). As perdas econômicas são mensuradas em torno de 5 a 25% da produção leiteira (SANTOS e FONSECA, 2007).

De origem infecciosa em sua grande maioria, tanto as mastites subclínicas como clínicas, podem ser classificadas como contagiosa e ambiental sendo no primeiro caso causados por patógenos que são encontrados na pele e mucosas dos animais e ambientais por aqueles patógenos que são encontrados principalmente no ambiente onde os animais são mantidos, incluindo-se todas as instalações onde são manejados (LANGONI, 2013).

Microrganismos contagiosos são comumente encontrados no úbere ou superfície do teto de vacas infectadas e são a principal fonte de infecção entre os quartos não infectados e infectados do úbere, geralmente durante a ordenha (SÁ et al., 2018).

Staphylococcus spp. constitui o principal gênero de bactérias causadoras de mastite bovina nos rebanhos do Brasil e do mundo (GAO et al., 2012). Em algumas regiões a adoção de programas de controle rígido, incluindo descarte de vacas repetidoras de mastite por este microrganismo propiciaram redução significativa na sua prevalência. Uma característica importante e que influencia no tratamento das mastites é que este patógeno coloniza o epitélio do teto, fixando-se nas células epiteliais da glândula mamária dificultando a ação dos antimicrobianos. As glândulas infectadas diminuem a produção de leite pela destruição permanente do parênquima, originando áreas de fibrose e microabscessos que protegem o agente dos mecanismos de defesa do úbere, como a fagocitose pelos neutrófilos (RIBEIRO et al., 2016).

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista um considerável número de estirpes possuem a capacidade de produzir exotoxinas (HAIT et al., 2014). Nesse contexto, a capacidade de produção de toxinas por *S. aureus* no leite e produtos derivados está relacionado com surtos de intoxicação alimentar (ACOSTA et al., 2017). Esse microrganismo é considerado o agente mais importante da mastite considerando-se a sua alta contagiosidade (HOGEVEEN et al., 2011).

A indicação do tratamento de longa duração, ou terapia estendida, tem melhorado a resposta ao tratamento em casos de mastite por *S. aureus*, no entanto, com 30-50% de cura. Do ponto de vista do manejo dos animais, devido a alta contagiosidade deste patógeno, sua persistência no rebanho e custo em função ao tratamento, muitas vezes, o descarte do animal tem sido priorizado a fim de controlar os casos de mastite em propriedades. As medidas de controle são muito importantes para contribuir com a redução de casos de mastite por este patógeno (LANGONI et al., 2017).

Ressalta-se, a importância da mastite em relação à saúde pública, devido ao envolvimento de bactérias patogênicas que podem colocar em risco a saúde humana (COSER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014).

Para o diagnóstico da mastite clínica, realiza-se exame criterioso da glândula mamária e o teste da caneca de fundo negro ou prova de Tamis, onde são observadas alterações macroscópicas nos primeiros jatos de leite (SÁ et al., 2018).

Na forma subclínica não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere, mas sim uma de infecção assintomática, caracterizada principalmente por

mudanças na composição do leite que podem ser detectadas, dentre outras metodologias, pelo California Mastitis Test (CMT). A ausência de sinais clínicos da mastite subclínica relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (SILVA, 2016).

Desta forma, a contagem de CCS constitui um importante recurso para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula por indicar a ocorrência de mastite subclínica e de possíveis perdas econômicas (MENDES et al., 2010). O exame bacteriológico do leite é o procedimento para estabelecer se o úbere está infectado.

O “Califórnia Mastite Test”, teste que também é utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica, possui a vantagem pela sua praticidade e rapidez do resultado, principalmente por ser um teste que pode ser realizado à campo. É baseado na estimativa de células somáticas no leite. O reagente de CMT é um detergente com indicador de pH, que ao ser misturado ao leite em partes iguais, dissolve as paredes celulares e nucleares dos leucócitos presentes, liberando o material nuclear. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura do leite e reagente, sendo realizado em bandeja apropriada (AIRES, 2010).

É importante ressaltar que o CMT é um ótimo teste de triagem, mas é através da contagem de células somáticas que é possível afirmar a condição subclínica (SADEK et al., 2017).

As descobertas iniciais revelam que a mastite pode ser controlada por condições higiênicas em rebanhos, como manter animais longe da água estagnada, uso de solução desinfetante no úbere antes de ordenhar e descarte de animais (KALIWAL e KURJOGI, 2011).

Para controlar a mastite dentro dos rebanhos é necessário que se adote medidas sanitárias rigorosas. As práticas do pré *dipping* e pós *dipping*, assim como, o isolamento microbiano dos animais considerados assintomáticos, devem ser consideradas como práticas rotineiras nas propriedades produtoras de leite (ARTUSSON et al., 2016).

O papel do ordenhador é considerado fator crucial na propriedade leiteira, a sua falta de conhecimento em relação à doença, problemas com o saneamento ambiental da área de criação e o manejo inadequado dos animais no período durante a ordenha são os principais fatores de risco identificados e estes devem ser corrigidos

para reduzir os casos da doença e otimizar a produção de leite no país (ACOSTA et al., 2016).

Além disso, outro fator importante é o tratamento dos animais acometidos, seja durante a lactação ou no período de secagem, o sucesso dessas medidas depende de alguns aspectos importantes, como escolha do medicamento adequado, da distribuição dos ativos dentro da glândula mamária, do estado fisiológico do animal, da precocidade com que a terapêutica de tratamento é estabelecida e de qual microrganismo está envolvido. Desta maneira, é muito importante identificar os patógenos envolvidos e usar os medicamentos que tenham melhor efeito, visto que microrganismos de uma mesma espécie, dentro do mesmo rebanho, podem ter sensibilidades distintas (COSTA et al., 2013).

Entende-se que o impacto das mastites na produção de leite está diretamente relacionado ao grau de lesão do tecido mamário, sendo maiores as alterações nos componentes do leite e mais elevadas as contagens de células somáticas (CCS). A redução na produção de leite deve-se à lesão de células epiteliais secretoras da glândula mamária infectada (LANGONI et al., 2017).

A múltipla etiologia da mastite contribui para o elevado impacto sobre a produção leiteira, dentre os agentes responsáveis por esta enfermidade, destacam-se bactérias do gênero *Staphylococcus*, que são os agentes etiológicos mais importantes nas mastites bovinas (BARDIAU et al., 2016).

2.3 *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são bactérias gram-positivas, mesófilas com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8° C; pH ideal para seu desenvolvimento entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3; e valor mínimo de atividade de água é 0,86 (SANTANA et al., 2010). As enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, contudo, a temperatura ótima para produção de enterotoxinas fica entre 40°C e 45°C (JAY, 2005).

Em especial, *Staphylococcus aureus* é reconhecido como importante causador de quadros agudos e crônicos da mastite bovina. A cronicidade dessa doença está ligada a vários fatores de virulência, entre os quais: formação de biofilme, sobrevivência intracelular, expressão de cápsula e grupo agr (*accessory gene regulator*) (BARDIAU et al., 2016).

Em *Staphylococcus aureus* os fatores de virulência não são expressos constantemente. É vantajoso para a bactéria coordenar quando esses fatores serão produzidos. A expressão da maioria dos genes de virulência de *S. aureus* é controlada pelo sistema de regulação global composto por dois operons divergentes, denominado *agr*. A expressão do sistema *agr* contribui com a patogênese estafilocócica em diferentes momentos da infecção (MARTINS et al., 2013).

Staphylococcus aureus, o principal patógeno das mastites, geralmente é encontrado no interior da glândula mamária, canal do teto ou na sua pele, principalmente quando lesada. A sua prevalência varia de 81 a 94% (CONTERAS e RODRIGUEZ, 2011).

A prevalência de *Staphylococcus aureus*, como grande causador da mastite bovina, pode estar relacionada aos mecanismos de resistência, presença do biofilme, menor susceptibilidade aos antibióticos, ao pequeno número de cura durante a lactação e à presença desses microrganismos no ambiente, nos animais e no homem, considerando que esses patógenos não são classificados como ambientais (OLIVEIRA e MEDEIROS, 2015).

As mastites causadas pelo *S. aureus* são caracterizadas por apresentarem baixa resposta ao tratamento e alta recidiva, quando comparado a outros microrganismos, e este fenômeno pode estar associado à habilidade de produzir biofilme (SZWEDA et al., 2014).

A taxa de cura da mastite causada por *Staphylococcus aureus* com antibioticoterapia durante a lactação é muito baixa. Muitos animais infectados que tornam-se crônico, são encaminhados ao abate (KULKARNI e KALIWAL, 2013).

O monitoramento da resistência em *S. aureus* é importante, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência (COSTA et al., 2013).

A ocorrência natural desse patógeno em glândulas mamárias de vacas, como agente etiológico de mastites, também contribui para sua ocorrência no leite e derivados. Desse modo, além de causador da mastite, esses microrganismos em números elevados representam risco potencial para saúde do homem, uma vez que produzem enterotoxinas termoestáveis que podem causar intoxicação alimentar (OLIVEIRA et al., 2011).

Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies biológicas, quanto

inertes. Em muitos casos clínicos a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica (ARCHER et al., 2011). O biofilme confere proteção contra as defesas do sistema imune do hospedeiro, assim como da ação dos antibióticos (BOZIC et al., 2014).

A capacidade de *S. aureus* em formarem biofilmes “in vivo” é considerada o maior fator de virulência na patogenia da mastite (MELO, 2008). A formação de biofilmes é considerada uma vantagem que esses agentes isolados de mastite bovina possuem, facilitando a permanência dos mesmos no úbere. Isto requer a adesão das bactérias no epitélio mamário com proliferação e formação de multicamadas de células envolvidas por uma matriz polimérica conhecida como exopolissacarídeo (MELO et al., 2012).

2.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Entre os vários fatores de virulência intrínsecos aos *Staphylococcus aureus* relacionados com a mastite, destaca-se a capacidade de produzir toxinas (RALL et al., 2014).

A produção de toxinas, constitui um dos grandes problemas causados por *S. aureus* que contribuem para a patogênese da infecção intramamária. Desse modo, esse microrganismo representa também um risco para a saúde pública, devido ao fato que o leite mesmo pasteurizado, pode apresentar contaminação por enterotoxinas termoestáveis, causando distúrbios alimentares no consumidor (SAEKI et al., 2011).

A multiplicação dos microrganismos e a produção de toxinas danificam o tecido secretor glandular, causando traumatismo e irritação química (KULKARNI e KALIWAL, 2013).

Neste sentido, uma vez produzida por *S. aureus*, essas toxinas podem ser veiculadas pelo leite desses animais acometidos, e neste contexto *Staphylococcus aureus* destaca-se entre as espécies do grupo coagulase positiva, por ser mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (GANDRA et al., 2016).

As temperaturas mínimas e máximas de crescimento e produção de toxinas assumem condições ótimas diferentes de acordo com os outros parâmetros, como concentração de sais, atividade de água e pH. Uma característica importante das enterotoxinas é sua termoestabilidade (100°C/30 minutos), que lhes confere resistência a tratamentos térmicos, como a pasteurização. Em alimentos, a

patogenicidade de estafilococos é relacionada principalmente à produção de enterotoxinas, causadoras de intoxicação (JAY, 2005).

A produção de enterotoxinas também será influenciada pelo tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, e condições atmosféricas do substrato. Em ótimas condições, a enterotoxina torna-se detectável entre 4 a 6 horas (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Um considerável número de estirpes da *S. aureus* tem a capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas (HAIT et al., 2014), sendo um dos agentes mais comuns responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, por serem normalmente transmitidos aos alimentos (PRADO et al., 2015). A intoxicação é decorrente da ingestão de enterotoxinas pré formadas no alimento contaminado pela bactéria, a qual pode continuar viável ou não (TEIXEIRA et al., 2008).

Atualmente, 23 enterotoxinas foram identificadas, incluindo Sea, Seb, Sec, Sed e See (WU et al., 2016). Sua nomeação ocorre de acordo com as letras do alfabeto e com a ordem cronológica de sua descoberta (DINGES et al., 2000). Sea é mais frequentemente envolvida na intoxicação alimentar causada por estafilococos (WU et al., 2016). Segundo Rall et al. (2014), o gene para produção de enterotoxina Sea foi o mais prevalente em amostras de leite de vacas com mastite subclínica e sadias no Brasil, sendo detectado em 52,5% nos animais com mastite subclínica.

Para Zoli et al. (2002), as enterotoxinas Sea e See possuem grande importância, pois a maioria das intoxicações são produzidas principalmente pela ingestão dessas duas enterotoxinas, sendo necessário também uma quantidade menor de microrganismos para a sua produção, quando comparadas aos outros tipos de enterotoxinas.

A prevalência em relação aos surtos envolvidos por intoxicação pela ingestão de toxina estafilocócica variam nos diversos países e em diferentes regiões de um mesmo país, devido às diferenças nos hábitos alimentares (PRADO et al., 2015).

A presença de *S. aureus* enterotoxigênicos no leite cru significa um risco potencial para os consumidores, e sua identificação pelos métodos moleculares deve ser realizada como parte da análise de fatores de risco presentes no leite e derivados (WHO, 2007).

Acosta et al., (2017) encontraram enterotoxinas Sea (33,3%) e Sed (7,4%) em 27 isolados de *S aureus* isolados do leite de tanques comunitários em Alagoas. Nesse estudo não foi identificado o gene Seb.

Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies biológicas quanto inertes. Em muitos casos clínicos, a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica (ARCHER et al., 2011).

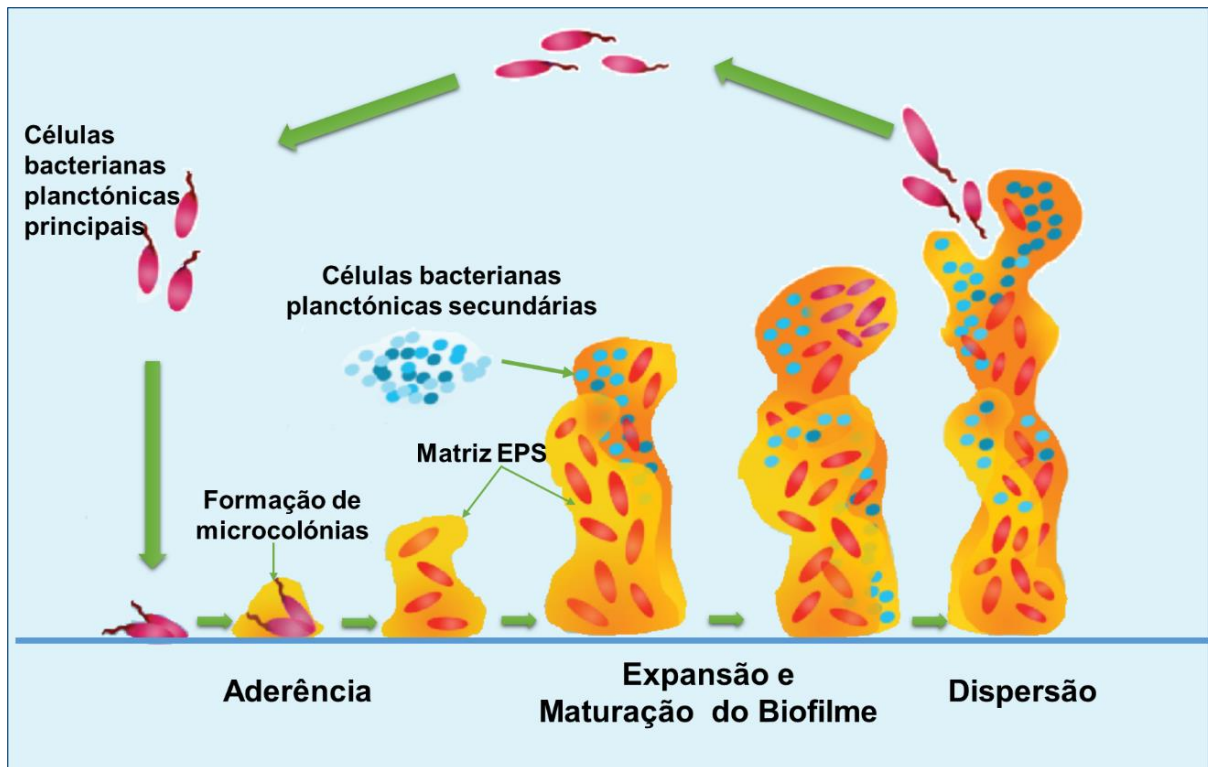
2.5 BIOFILMES

O biofilme é uma matriz constituída por microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), partículas retidas e substâncias dissolvidas e absorvidas. A funcionalidade do biofilme, assim como suas características morfológicas e estruturais são dependentes da matriz polimérica, que também determina as características físico-químicas e biológicas (CHAGAS et al., 2015).

Estas estruturas, são constituídas de células livres (planctônicas) que se aderem a uma superfície, proliferam e se acumulam em camadas (células sésseis). As primeiras colônias facilitam a chegada de outras células, favorecendo locais de adesão mais numerosos e iniciando o processo de construção da matriz que contém o biofilme (DONLAN e COSTERTON, 2002).

O biofilme segue uma sequência bem organizada de formação (Figura 1), que não difere muito entre as espécies bacterianas, sendo constituído por três fases: aderência ou fixação, acumulação/maturação, e separação/dispersão. Durante a fase de ligação, as células planctônicas aderem às superfícies bióticas ou abióticas e proliferam em agregados adesivos chamados de micro colônias, também conhecidas como torres ou estruturas semelhantes a cogumelos. A medida que essas micro colônias se desenvolvem, as células bacterianas produzem uma matriz extracelular que serve como um suporte essencial para estabelecer a arquitetura tridimensional. Ao atingir uma densidade celular específica, é desencadeado um mecanismo de degradação da matriz, o qual libera células para dispersar e reiniciar o desenvolvimento do biofilme em locais diferentes (MOORMEIER e BAYLER, 2017).

A dinâmica das formações dos biofilmes e da saída dos microrganismos para a formação de novos biofilmes pode explicar a natureza de infecções pelo mesmo, e a necessidade de extensão da terapia a fim que quebrar o ciclo de formação dos biofilmes (MELCHIOR et al., 2005).



Fonte: <http://know.net/cienterravida/biologia/biofilme/>

Figura 1: Etapas da formação de biofilme microbiano.

A adesão e a formação do biofilme são dependentes de características do microrganismo, como expressão de fatores de virulência e produção da cápsula exopolimérica. A superfície aderente e outros fatores como pH, temperatura, tempo de agitação, dentre outros, também influenciam na formação destas estruturas (CAIXETA et al., 2012).

Biofilmes podem ser compostos por comunidades homogêneas, derivadas de uma única espécie ou por comunidades heterogêneas, formadas por comunidades de várias espécies bacterianas ou até mesmo por fungos, leveduras, algas e outros organismos unicelulares. O primeiro caso é raro e incomum na natureza. Biofilmes heterogêneos são os mais comumente encontrados (SAUER; RICKARD e DAVIES, 2007).

Em ambientes naturais, as células microbianas necessitam adaptar-se às alterações no meio vizinho enquanto que as células dentro dos biofilmes não necessitam desta adaptação, pois as matrizes dos biofilmes proporcionam a troca de nutrientes orgânicos. Muitos polímeros das matrizes são de natureza aniônica, assim

podem se ligar aos cátions e proporcionar a reserva destes nutrientes, o que faz com que as matrizes funcionem como reserva de energia e carbono (MARQUES, 2005).

A habilidade de certas espécies de *Staphylococcus* spp. se aderirem à superfície do epitélio da glândula mamária está associada à produção de biofilmes, compostos de multicamadas de células embebidas em uma matriz (MELO et al., 2012). Ao formarem uma comunidade de microrganismos, as bactérias que vivem nos biofilmes passam a viver em grande proximidade com outras bactérias da mesma estirpe ou de espécies diferentes. Devido à proximidade das células microbianas nas matrizes dos biofilmes, a competitividade por nutrientes disponíveis é muito grande, por isso, os agentes microbianos que entram nas matrizes acabam destruindo as células vizinhas (MARQUES, 2005).

Muitas bactérias inseridas no biofilme, desenvolveram mecanismos rudimentares de comunicação bacteriana, cujo fenômeno é conhecido por “quorum sensing” (NADELL et al., 2008). Esse mecanismo é um dos principais responsáveis pela manutenção das atividades de um biofilme (YU et al., 2012).

Inicialmente o “quorum sensing” foi descrito em bactérias Gram negativas, e logo depois descobriu-se que biofilmes compostos por bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, também possuem esta capacidade (ANTUNES et al., 2010). Uma das vantagens descritas do mecanismo de “quorum sensing” é a rápida adaptação a alterações ambientais (OTTO, 2004). Outra vantagem evolutiva foi descrita como a de possibilitar às populações de bactérias presentes no biofilme distinguirem “self de non-self”, isto é “sentirem” a densidade populacional de bactérias da mesma espécie/estirpe dentro de um biofilme que muitas vezes é composto por mais de um tipo de microrganismo (NOVICK e GEISINGER, 2008).

Esta capacidade de detecção da densidade ou quantidade de bactérias da mesma estirpe, através da concentração de produtos metabólicos segregados permite aos microrganismos gerir o seu metabolismo de forma a utilizar os recursos disponíveis mais eficientemente e também responder mais eficientemente a desafios, como por exemplo a agentes antimicrobianos (JAYARAMA e WOOD, 2008).

A produção de biofilme é regulada por um conjunto de genes que ficam localizados no locus *ica*, os quais são responsáveis pela adesão intercelular. No operon *icaABCD*, os genes *icaA* e *icaD* têm maior relevância em *S. aureus* (DHANAWADE et al., 2010).

O gene *icaA* é responsável por codificar a N-acetilglucosaminiltransferase, enzima que participa da produção de oligômeros de N-acetilglucosamina da UDP-N-acetilglucosamina. Enquanto, *IcaD* desempenha um papel crítico na expressão máxima de N-acetilglucosaminiltransferase, levando à produção do polissacarídeo capsular. Também existe uma outra proteína que é conhecida como Bap, a qual está envolvida na formação do biofilme por *S. aureus*. Esta proteína, codificada pelo gene Bap, está implicada na formação de biofilme através da fixação primária e adesão a superfícies. Isolados que apresentem o gene *bap* são capazes de produzir forte biofilme mesmo na ausência do operon *icaABCD* (SALIMENA et al., 2016).

Foi constatado por Salimena et al. (2014) que *S. aureus* possuem a capacidade de adesão à superfície de polipropileno a partir de 48 horas de contato, e a adesão aumenta em pequena proporção com até 240 horas.

Para se alcançar a inibição da formação de biofilmes, duas grandes classificações podem ser feitas: através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, através do bloqueio da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação de biofilme por uma via que não envolve a morte bacteriana - característica marcante de um novo conceito de terapia: as terapias antivirulência. As terapias antivirulência exploram novos mecanismos de ação de compostos, visando dificultar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana (TRETIN et al., 2013).

Para Melo et al. (2012) a habilidade dos *S. aureus* se aderirem à superfícies está associada à produção de uma camada espessa de polissacarídeos, o "slime", que auxilia na aderência e colonização dos microrganismos e com isto formam-se os biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz. A formação de biofilmes nas superfícies de plantas de processamento de alimentos por bactérias patogênicas é uma fonte de risco de contaminação cruzada, pois as bactérias aderentes ao biofilme podem contaminar os alimentos durante a produção deste ao passarem sobre estas superfícies (SOUZA et al., 2014).

A análise da produção de biofilme pela aderência em placa, cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pelos *Staphylococcus* spp. sendo então possível verificar se as estirpes são boas formadoras de biofilme ou não (MELO et al., 2012). Segundo Stepanovic et al. (2000), esse método é utilizado com maior frequência para quantificar a formação de biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp., além de funcionar como indicador de patogenicidade dos microrganismos.

A capacidade de produção de biofilme está presente na maioria das espécies de *Staphylococcus* spp. Esse mecanismo permite a sobrevivência da bactéria no ambiente por longos períodos, além de impedir a ação de antibióticos e desinfetantes (TREMBLAY et al., 2013).

Causas descritas como responsáveis pela resistência são: a penetração limitada do agente antibiótico pela matriz do biofilme (MAH e O'TOOLE, 2001), a alteração da taxa de crescimento dos microrganismos que compõem o biofilme (LEWIS, 2001) assim como outras alterações fisiológicas, incluindo a expressão de possíveis genes de resistência (DONLAN e COSTERTON, 2002).

2.6 DESINFETANTES UTILIZADOS NO PRÉ E PÓS DIPPING

A utilização do *pré-dipping* e *pós-dipping* constitui uma prática sanitária indispensável para se obter êxito no controle da mastite, é uma atividade que deve ser praticada diariamente nas propriedades produtoras de leite (ARTUSSON et al., 2016). Segundo Acosta et al. (2016), a não desinfecção dos tetos antes e após a ordenha constitui importante fator de risco associado à ocorrência da mastite em rebanhos bovinos.

Se trata de um processo de antissepsia dos tetos, amplamente recomendado no controle da mastite, por reduzir o número de bactérias na pele do teto e curar lesões de teto pré-existent (SANTOS et al., 2016). Com a adoção desta prática, estima-se uma redução de até 85% dos casos de mastite subclínica no rebanho (SILVA et al., 2015). Para patógenos contagiosos como *S. aureus*, essa antissepsia após a ordenha permanece como uma prática simples, efetiva e economicamente viável na prevenção de novas infecções intramamárias (SANTOS et al., 2016).

É importante salientar que no momento da ordenha, os tetos estejam limpos e que o *pré dipping* tenha sido realizado, a fim de evitar contaminações por *S. aureus*, uma vez que, essa bactéria pode ser encontrada em vacas com precária higiene do úbere (AZEVEDO et al., 2016).

Nos dois processos necessita-se de conhecimento por parte do responsável pela ordenha para que de fato seja reduzida a carga microbiana no *pré dipping* e para que se evite a contaminação do úbere no *pós dipping* (ACOSTA et al., 2016).

O processo de sanitização visa a destruição de microrganismos a níveis toleráveis, eliminando células vegetativas. De forma que, o produto a ser utilizado

deve ter sua atividade antimicrobiana comprovada na pele do teto, além de não ter sua atividade germicida afetada pela presença de matéria orgânica como leite, fezes ou urina (CAIXETA et al., 2012).

Clorexidine há algum tempo está entre os princípios ativos mais utilizados na desinfecção dos tetos no pré e pós *dipping* (MEDEIROS et al., 2009). Possui grande vantagem por possuir amplo espectro de ação e não ser inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica (SANTOS e FONSECA, 2007). Possui uma menor redução de sua atividade germicida por material orgânico do que alguns outros antissépticos comuns, como o cloro (SPINOSA et al., 2011). Para Coutinho et al. (2012), este desinfetante pode ser utilizado como uma das primeiras opções no pré e pós-*dipping*.

O clorexidine atua em bactérias aeróbias e anaeróbias, sejam elas Gram positivas ou negativas, e possui ação bactericida ou bacteriostática dependendo da concentração utilizada. Rotineiramente, soluções mais concentradas são bactericidas, onde ocorre o rompimento da membrana citoplasmática da bactéria, já em concentrações baixas, possui efeito bacteriostático a qual impede a síntese de ATP da bactéria (MICHELOTTO et al., 2008). Cruz et al. (2012) afirmam que soluções utilizadas com concentração de 5% são severamente citotóxica.

O ácido láctico também está entre os princípios ativos que compõe as principais formulações utilizadas como desinfetantes de tetos no manejo de ordenha. Clorexidine e ácido láctico estão inseridos na lista de desinfetantes mais comumente utilizados no pré *dipping* (SANTOS et al., 2018). Essas substâncias são utilizadas com mais frequência graças à sensibilidade ocasionada aos microrganismos causadores de mastite (MEDEIROS et al., 2009; COUTINHO et al., 2012).

Em alguns estudos foram observados resultados satisfatórios da ação de clorexidine contra *S. aureus* isolados de casos de mastite (MEDEIROS et al., 2009; RAMALHO et al., 2012). Enquanto, o ácido láctico desempenhou maior atividade desinfetante frente aos *Staphylococcus* coagulase positiva, e sua ação foi ainda melhor quanto maior foi o tempo de exposição (MEDEIROS et al., 2009).

O uso apropriado de agentes desinfetantes tem como objetivo reduzir suficientemente a população de microrganismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos (RAMALHO et al., 2012). Existe certa dificuldade para se obter o produto ideal, portanto para escolha do mais apropriado, devem-se considerar o amplo espectro de ação, atoxicidade, ação irritante aos tecidos

de seres humanos e de animais, concentração, propriedades físico químicas e custo (PEDRINI e MARGATHO 2003; MARGATHO et al., 2014).

Devido a diversidade dos agentes infecciosos envolvidos nos casos de mastite, deve-se enfatizar a importância da utilização de produtos que em uma única concentração possa atuar no pré e pós *dipping*, mantendo suas propriedades desinfetantes, sem causar danos à saúde do animal ou a qualidade do produto (COUTINHO et al., 2012). Entretanto, muita cautela deve ser adotada, pois a escolha inadequada de baixas concentrações antissépticas ou insuficientes pode levar à seleção natural de isolados bacterianos resistentes na população microbiana (AZIZOGLU et al., 2013)

S. aureus na forma de biofilme se torna mais resistente aos sanificantes (MARQUES et al., 2007). Sabendo-se que o processo de infecção da glândula mamária causada por estirpes desta espécie ocorre via ascendente pelo canal do teto, e tendo em vista, a capacidade dos mesmos se aderirem e formarem biofilmes permanecendo nos alvéolos, evidencia-se a importância da realização de antissepsia dos tetos, por meio da utilização do pré e pós-dipping na profilaxia da mastite (MELO et al., 2012).

Peixoto et al. (2015) salientam a importância de avaliar produtos utilizados no pós-dipping quanto a sua capacidade de impedir a adesão de células bacterianas, bem como, sua ação sobre biofilme consolidado. Isso porque, células em biofilmes são muito mais resistentes à desinfecção quando comparadas às células planctônicas, desta forma, muitos métodos convencionais de desinfecção são ineficientes contra biofilmes, sendo necessário, por vezes, doses elevadas (CLONTS, 2008).

Essa resistência está associada tanto à baixa penetração dos compostos antimicrobianos no biofilme, como pelo estado fenotipicamente protegido, induzindo nas bactérias que o compõe (ALTIERI et al., 2013). A estabilidade de um biofilme se deve a presença de proteínas e carboidratos, que quando depositados, dificultam de forma elevada a ação de compostos sanificantes e antimicrobianos (WANG et al., 2013).

Para remover organismos do biofilme, as soluções de sanitização devem penetrar na matriz de exopolímeros e acessar as células microbianas, assim causa a inativação e remoção do biofilme (SOUZA et al., 2014).

2.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A mastite é considerada uma das principais causas para o uso de antibióticos em bovinos leiteiros (KALIWAL et al., 2011). O que implica em um aspecto de vital importância no controle desta enfermidade, à resistência dos patógenos aos antimicrobianos, e isso decorre não só pela dificuldade no êxito do tratamento da doença, como também pelo alto risco que representa para a saúde pública (ACOSTA et al., 2016).

A eficácia do tratamento está relacionada com o patógeno envolvido, e associada ao grau de lesão do parênquima mamário. Nos casos de *Staphylococcus aureus* a resposta é sempre inferior, ao se comparar com outros microrganismos patógenos contagiosos. Nos casos de patógenos ambientais, a resposta é melhor, havendo inclusive maiores taxas de cura espontânea, não ocorrendo praticamente nos casos de *S. aureus* (OLIVER et al., 2004).

O uso de antimicrobianos requer cuidados, considerando-se os aspectos de resíduos no leite e do desenvolvimento de resistência. Desta forma, ao se iniciar o tratamento é interessante avaliar cada caso e minimamente optar por antimicrobianos de amplo espectro e de preferência de acordo com o histórico da propriedade e do perfil de sensibilidade dos patógenos isolados dos casos de mastites anteriores (LANGONI et al., 2017).

A resistência bacteriana é uma das maiores dificuldades para produção, e os mecanismos de resistência aos antibióticos tem sido descrito para muitos produtos que são usados na rotina da clínica veterinária (CARMO et al., 2013).

A resistência aos antibióticos está relacionada ao uso indiscriminado para o tratamento e prevenção da mastite em rebanhos bovinos (ASLANTAS e DEMIR, 2016). *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes das mastites do rebanho leiteiro em vários países do mundo. O aparecimento de cepas multirresistentes a antibióticos tem dificultado o tratamento dessas infecções (ZANETTE et al., 2010).

Além disso, a presença desses microrganismos em biofilmes demonstram elevada resistência a antimicrobianos, o que pode comprometer ainda mais o tratamento e controle (MATHUR et al., 2005).

A capacidade de *S. aureus* formar biofilme é considerada um importante determinante de virulência, que contribui para sua patogênese na mastite, protegendo a bactéria das defesas do organismo e ação de antibióticos (GOETZ et al., 2017).

A alta resistência das bactérias aos antimicrobianos é um tema de especial interesse na saúde pública, pois os animais infectados constituem fontes de patógenos para quem trabalha diretamente no manejo desses animais e para os consumidores do leite ou derivados indevidamente processados (ACOSTA et al., 2016).

A resistência de *Staphylococcus* spp. deve sempre ser monitorada, principalmente levando-se em consideração que o uso indiscriminado de antimicrobianos contribui para a seleção de cepas resistentes, dificultando o tratamento dos distúrbios animais. Tal conduta minimiza falhas terapêuticas e os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, problemas bastante discutidos nos campos da saúde humana e animal (COSTA et al., 2013).

Atualmente, a vancomicina é um dos antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus*, sendo considerada o padrão para terapia de doenças invasivas (BOTELHO, 2017), e infecções mais graves causadas por *S. aureus* multirresistentes (WEIGEL et al., 2003).

Zanette et al. (2010), encontraram percentuais satisfatórios de eficácia da vancomicina frente à *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite.

A utilização da vancomicina como tratamento terapêutico surgiu como consequência do aumento das taxas de resistência de *Staphylococcus aureus* à oxacilina, antibiótico que era comumente utilizado para tratamento de infecções ocasionadas por esse patógeno há décadas. Desse modo, a prescrição de vancomicina tornou-se cada vez mais frequente, muitas vezes de forma indiscriminada (MIMICA e BEREZIN, 2006).

A vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos e atua inibindo a síntese da parede celular (LUNA et al., 2010). A ação dessa classe de antimicrobianos se dá pela ligação à D-alanil-Dalanina da molécula de peptideoglicano, o que impede a formação de novas unidades dessa substância. A vancomicina é conhecida desde 1956, no entanto, sua utilização foi substituída pela meticilina, devido a maior eficiência (BOTELHO, 2017).

Em 1996, *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) foram identificados pela primeira vez em uma amostra de um paciente no Japão que usou vancomicina várias vezes e durante um tempo prolongado (HIRAMATSU et al., 1997).

Em junho de 2002 o primeiro *S. aureus* com resistência plena à vancomicina (VRSA: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) foi identificado em Michigan-

EUA (CHANG et al, 2003). Foi o primeiro caso conhecido de *S. aureus* resistente à vancomicina que possuía o gene *vanA*. Esta cepa foi obtida de material colhido do orifício de saída de um cateter e de uma úlcera no pé, de um paciente em diálise (MIMICA e BEREZIN, 2006).

Acredita-se que o mecanismo de resistência do *S. aureus* contra a vancomicina esteja relacionado com o envolvimento do gene *VanA*, que determina a resistência a essa droga em *Enterococcus*, que, provavelmente, é capaz de transmitir essa resistência, por meio de plasmídeos, para *S. aureus*, uma vez que esse fenômeno foi observado em laboratório (TIWARI e SEN, 2006)

Para Weigel et al. (2003) um plasmídeo contendo o transposon do gene *vanA*, Tn1546, de um *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina foi transferido para um *S. aureus* resistente à oxalilina, que já possuía um plasmídeo codificando resistência à gentamicina e produção de beta-lactamase. O transposon foi incluído no plasmídeo estafilocócico e o restante do plasmídeo enterocócico foi perdido.

Este novo plasmídeo manteve a capacidade de ser transmitido para outros estafilococos e de expressar de forma plena a resistência à vancomicina (SEVERIN et al., 2004).

Além das preocupações sobre o desenvolvimento de resistência, a eficácia da vancomicina também pode ser limitada pela baixa penetração nos tecidos, pelo lento efeito bactericida e pela toxicidade (KOLLEF, 2007). Portanto, o uso adequado da vancomicina deve incluir a dosagem de seus níveis séricos de assegurar sua atividade adequada e evitar a toxicidade, bem como testes de sensibilidade aos antimicrobianos para prevenir o desenvolvimento de resistência (RYBAK et al., 2009).

Outro antimicrobiano rotineiramente utilizado no tratamento da mastite bovina é a tetraciclina (COSTA et al., 2013). Esse fármaco possui um excelente índice terapêutico e baixo custo. Entretanto, o uso excessivo e por longo tempo das tetraciclina manteve uma contínua pressão seletiva, o que proporcionou o surgimento da resistência em bactérias previamente suscetíveis. Como resultado, o uso de tetraciclina diminuiu significativamente (THAKER et al., 2010).

Descoberta há 60 anos como a primeira classe de antibióticos de amplo espectro, as tetraciclina foram rapidamente utilizadas na medicina humana, na veterinária e na agricultura, especialmente por possuírem poucos efeitos colaterais (THAKER et al., 2010).

A tetraciclina é um antimicrobiano de amplo espectro, com ação bacteriostática e usado para uma grande variedade de bactérias Gram positivas e negativas. A tetraciclina se difunde no interior da célula hospedeira e se liga à subunidade 30S do ribossomo, esta ligação impede a síntese proteica (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

O gene *tetK* é frequentemente encontrado em *S. aureus* (TRZCINSKI et al, 2000). Este gene confere resistência por meio de proteínas de efluxo que impedem a acumulação de tetraciclina dentro das células.

Os genes *tet* são frequentemente carregados por plasmídios conjugativos, os quais permitem a mobilidade através da transferência genética, inseridos em transposons (AUERBACH et al., 2007), mas existem relatos da presença de genes *tet* no cromossomo bacteriano (ZHANG et al., 2009).

Tetraciclinas inibem a síntese de proteínas não permitindo a associação do aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano. Desse modo, para interagir com seus alvos essas moléculas precisam atravessar uma ou mais membranas dependendo se o microrganismo é Gram positivo ou negativo (THAKER et al., 2010).

A resistência à tetraciclina se dá pela aquisição de mais de um gene, há 38 genes conhecidos que conferem esta resistência, e todos utilizam uma das três estratégias: proteínas de efluxo, proteínas de proteção ribossomal ou inativação enzimática da tetraciclina (ULLAH et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Objetivou-se com este estudo pesquisar *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e traçar o perfil de resistência frente à desinfetantes

3.2 Específicos

- Isolar e identificar *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de *Staphylococcus aureus* de formar biofilmes;
- Identificar genes formadores de biofilmes;
- Identificar genes produtores de enterotoxinas;
- Identificar genes de resistência microbiana;
- Avaliar *in vitro* o perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* a sanitizantes.

4. REFERÊNCIAS

ACOSTA, A.C.; SILVA, L.B.G.da; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. Artigo de Revisão. 2016. Pesquisa Veterinária Brasileira. 36(7):565-573.

ACOSTA, A.C.; SANTOS, S.J. dos; ALBUQUERQUE, L.; SOARES, K.D.A.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S. Frequência de genes codificadores de toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques expansão comunitários. Pesquisa Veterinária Brasileira. 37(7):691-696, 2017.

AIRES, A. C. P. Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. 2010. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

ALTIERI K.T., SANITA P.V., MACHADO A.L., GIAMPAOLO E.T., PAVARINA A.C., JORGE J.H. & VERGANI C.V. 2013. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. Braz. Dent. J. 24(5):487-449.

ANTUNES LC, FERREIRA RB, BUCKNER MM, FINLAY, BB. Quorum sensing in bacterial virulence. Microbiology 2010 August;156(Pt 8):2271-82.

ARCHER, N.K.; MAZAITIS, M.J.; COSTERTON, W.; LEID, J.G.; POWERS, M.E.; SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms – Properties, regulation and roles in human disease. Virulence, Vienna, v.2, n.5, p. 445-459, 2011.

ASLANTAS, Õ.; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from suclinical bovine mastitis cases. Journal of Dairy Science, v. 99, n. 11, p.8607-8613, 2016.

AUERBACH, E. A.; SEYFRIED, E. E.; McMAHON, K. D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Research. V. 41, p. 1143-1151, 2007.

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.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BARDIAU, M.; CAPLIN, J.; DETILLEUX, J.; GRABER, H.; MORONI, P.; TAMINIAU, B.; MAINIL, J.G. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*, 185: 1-6, 2016.

BERGDOLL, M.S. WONG, A.C.L. Staphylococccal intoxications, In: Cliver, D., Potter, M., Riemann, H.P. *Foodborne Infections and Intoxications*. 3ed. Califórnia: Academic Press, 2006. p. 523-556.

BOZIC, D. D.; MILENKOVIC, M.; IVKOVIC, B.; CIRKOVIC, I. Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Medical Research*, v. 140, p. 130-137, 2014.

BOTELHO, C. V. *Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína. 2017. 99p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil).

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F. Como reconhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos. Circular Técnica n.70. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora - MG, Dezembro, 2002.

CAIXETA, D.S.; SCARPA, T.H.; BRUGNERA, D.F.; FREIRE, D.O.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.1, p.142-150, 2012.

CARMO, A. M. A.; SALES, R. C.; GRACINDO, A. P. A. C.; PEREIRA, G. F.; ABRANTES, M. R.; SILVA, J. B. A.; SOUSA, Ê. S. Avaliação da sensibilidade in vitro a antimicrobianos de microrganismos isolados nos casos de mastite no município de Apodi/RN. IX CONGIC, Julho de 2013.

CHAGAS, L. G. da S.; MELO, P. de C.; LIMA, A. M. C.; RAMOS, G. B.; RODER, D. V. D. de B.; NADER-FILHO, A. Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de

Staphylococcus aureus em condições de biofilme. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v.52, n.3. p. 228-233. 2015.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342-1347, 2003.

CLONTS L. 2008. Como evitar a formação de biofilmes. Revta Controle de Contaminação 109:50-56.

CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUEZ, J.M. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16(4):339-356.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: controle e prevenção. In: Boletim Técnico - n. 93, p. 1-30, 2012. Universidade Federal de Lavras, LavrasMG.

COSTA, G. M. da; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. da C.; PEREIRA, U. de P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N da. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

COUTINHO, L.C.A.; MEDEIROS, E.S.; SILVEIRA, N.S.S.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. 2012. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vacas com mastite. Pesquisa Veterinária Brasileira. 32:61-65.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci. Technol. 91:127-150.

CRUZ, L.M.M.; NASCIMENTO, A.G.S.; SILVA, L.E; LEAL, B.; KALIL, M.T.A.C.; ALMEIDA, H.C.C. Avaliação da citotoxicidade das soluções de clorexidina nas concentrações de 2,5% a 5%. International Journal of Science Dentistry, n. 38, 2012.

DHANAWADE, N.B., KALOREY, D.R., SRINIVASAN, R., BARBUDDHE, S.B., KURKURE, N.V., 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Veterinary Research Communications 34, 81-89.

DIAS, N.L., SILVA, D.C.B., OLIVEIRA, D.C.B.S, FONSECA JUNIOR, A.A., SALES, M.L., SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia., v. 63, n.6, p.1547-1552,2011.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews, v.13, p. 16-34, 2000.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, v.15, n.2, p. 176-193, 2002.

DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V.O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Editora UPF, 2004. p.38-55.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Ciência Rural., v.34, n.4, p.1315-1320, 2004

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite., São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GANDRA, E. A.; FERNANDEZ, M. A.; SILVA, J. A.; SILVA, W. P. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. Ciência Rural, Santa Maria, Online, ISSN 1678-4596. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151391>. 2016.

GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; Han, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in a single herd in China. Veterinary Journal, v.192, p. 550–552, 2012.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? J Appl Microbiol. 2002; 92 Suppl: 98S-110S.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. Current Microbiology, New York, v. 72, n. 4, p. 377- 382, 2016.

GUIDO, E.S.; SILVA, E.D.P. da; SILVA, M.C. da; TAKEUCHI, K.P.; DANESI, E.D.G. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos. v. 28; n.2; p. 303-312, 2010.

HAIT J., TALLENT S., MELKA D., KEYS C. & BENNETT R. 2014. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *S. aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. J. Appl. Microbiol. 117:866-875.

HEMME, T; OTTE, J. Status and prospects for smallholder milk production – A global perspective. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 181 p. 2010.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997; 40(1):135-6.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa trimestral do leite. Dados divulgados em 14 de junho de 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>> acesso em: 10 de julho de 2018.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JAYARAMAN, A.; WOOD, T.K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. 10:145–67.

JUNG, C. F. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. Ágora. Santa Cruz do Sul, v.19, n. 01, p. 34-47, jan./jun. 2017.

KALIWAL, B.B.; M. KURJOGI. M.M. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis. Advances in applied science research. 2(6):229-235.

KALIWAL, B.B.; SADASHIV, S.O.; KURJOGI, M.M.; SANAKAL, R.D. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from Bovine Mastitis. Veterinary World, v.4, n.4, p.158- 161, 2011.

Kasnowski M.C., Mantilla S.P.S., Oliveira L.A.T. & Franco R.M. 2010. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de avaliação de superfícies. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 8(15): 1-23.

KOLLEF, M. H. Limitations of vancomycin in the management of resistant staphylococcal infections. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(Suppl 3):S191-5.

KULKARNI, A.G.; KALIWAL, B.B. Bovine mastitis: a review. *International Journal of Recent Scientific Research.* Vol. 4, Issue, 5, pp. 543- 548, May, 2013.

LANGONI, H., RIBEIRO, M.G., SANTOS, M.V., DOMINGUES, P.F., PINTO, J.P.A.N., NADER FILHO, A. IN: 4º ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. Anais... Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual de São Paulo, 2007. p. 8-17.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* V.33, n.5, p.620-626, 2013.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G.C.; JUNQUEIRA, N.B.; MENOZZI, B.D.; JOAQUIM, S.F. Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesq. Vet. Bras.* 37(11):1261-1269, 2017.

LEBLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Major advances in diseases prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences,* v.89, p.1267-1279, 2006.

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.

LUNA, C. M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2010; Vol 14 (Suppl 2):S121-S129.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9(1):34-9. 2001.

MARGATHO, L.F.F.; PEDRINI, S.C.B.; CURCI, V.C.M. Mastite bovina e o uso de antissépticos. *Pesquisa e Tecnologia,* v.11, n.1, p.1-7, 2014.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A.G. da; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. de. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuibá, MT. *Ciência Animal Brasileira.* Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2010.

MARQUES, C.S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MARQUES S.C., REZENDE J.G.O.S., ALVES L.A.F., SILVA B.C., ALVES E., ABREU L.R. & PICCOLI R.H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. Braz. J. Microbiol. 38:538-543.

MARTHUR, T. SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.; FATMA, T.; RATTAN, A.; Adverse Effect of *Staphylococci* Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides. Japanese Journal of Infectious Disease, Toyama, v.58, p. 353-357, 2005.

MEDEIROS E.S., SANTOS M.V., PINHEIRO J.W.J., FARIA E.B., WANDERLEY G.G., TELES J.A.A. & MOTA R.A. 2009. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. Pesq. Vet. Bras. 29(1):71-75.

MELO, P. de 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. 161 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2011.

MELO, P. de C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. Bioscience Journal. Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

MENDES, G. C. SAKAMOTO, S. M.; DA SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. Ciência Animal Brasileira, v.11, p.349-356, 2010.

MICHELOTTO, A.L.C.; ANDRADE, B.M.; SILVA, JUNIOR, J.A.; SYDNEY, G.B. Chlorhexidine in Endodontic Therapy. Revista Sul Brasileira de Odontologia, 5(1), 2008.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E.N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. Arquivo Médicos Hospitalares da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo 2006; 51(2):52-6.

MOORMEIER; BAYLES. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. Mol Microbiol, v. 104 p.365-376, 2017.

NADELL CD, XAVIER JB, LEVIN SA. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. PLoS Biology 2008; 6(1):171-9.

NGUYEN, U.T.; WENDERSKA, I.B.; CHONG, M. A.; KOTEVA, K.; WRIGHT, G.D.; BURROWS, L.L. Small-Molecule Modulators of *Listeria monocytogenes* Biofilm Development. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v.78, p. 1454-1465, 2012.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet 2008;42:541-64.

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.; HEADRICK, S.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.; JOHNSON, D.; LAMAR, K.; CHESTER, S.; MOSELEY, W. 2004. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 87:2393-2400.

OLIVEIRA, L.P.; BARROS, L.S.S.; SILVA, V.C.; CIRQUEIRA, M.G. Study of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. Journal of Food Processing and Technology, Los Angeles, n. 2, v.6, p. 2-5, 2011.

OTTO M. Quorum-sensing control in Staphylococci-a target for antimicrobial drug therapy? FEMS Microbiol Lett 2004;241:135-41.

PACHECO, W.F.; ARRUDA, P.C.L.; CARMO, A.B.R.; LIMA, F.W.R.; A cadeia produtiva do leite: um estudo sobre a organização da cadeia e análise de rentabilidade de uma fazenda com opção de comercialização de queijo ou leite. Revista Razão Contábil e Finanças, Fortaleza, v.3, n. 1, Jan./Jun. 2012

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P. ALMEIDA, W. B. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. Quim Nova. 2010; 33(3): 700-706.

PEDRINI S.C.B. e MARGATHO L.F.F. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 70(4):391-395.

PRADO, R. R.; FREITAS, E. A.; VALADARES JÚNIOR, E. C.; COSTA, P. C.; SIQUEIRA, M. C.; ROSSI, D. A. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2015.

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, 35(2): 105-109, 2015.

RALL, V.L.M.; MIRANDA, E.S.; CASTILHO, I.G.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; ARAÚJO JÚNIOR, P.J.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. J. Dairy Sci. v.97, p.829- 837, 2014.

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, 32(12):1285-1288, 2012.

RIBEIRO, W. O.; OLIVEIRA, R. L.; MARTINS, M. L. et al. Enumeração de microrganismos causadores da mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 1, p 45-52, 2014.

RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PANTOJA, J.C.F. 2016. Mastite em animais domésticos, p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Roca, Riode Janeiro.

RYBAK, M. J.; LOMAESTRO, B. M.; ROTSCAHLER, J. C.; MOELLERING, R. C.; CRAIG, W. A.; BILLETER, M.; DALOVISIO, J. R.; LEVINE, D. P. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Clin Infect Dis. 2009; 49(3):325-7.

SA, J.P.N. de; FIGUEIREDO, C.H.A. de; SOUSA NETO, O.L. de; ROBERTO, S.B. de A.; GADELHA, H.S.; ALENCAR, M.C.B. de. Os principais microrganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. Revista Brasileira de Gestão Ambiental (Pombal - PB - Brasil) v. 12, n.1, p.01- 13, 2018.

SADEK, K.; SALEH, E.; AYOUB, M. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. Trop. Anim. Health Prod., v.49, p.431-437, 2017

SAEKI, E.K.; MELLO PEIXOTO, E.C.T.; MATSUMOTO, L.S.; MARCUSSO, P.F.; MONTEIRO, R.M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SALIMENA, A. P. S. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *CES REVISTA*, Juiz de Fora, 2014, v. 28, n. 1. p. 88-102.

SALIMENA, A. P. S.; SANTOS JÚNIOR, A.C.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Scanning electron microscopy of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and polypropylene surfaces. *African Journal of Microbiology Research*, Nairobi, v. 8, n. 34, p. 3136-3143, Aug. 2014.

SALIMENA, A. P.S.; LANGE, C. C.; CAMUSSONE, C.; SIGNORINI, M.; CALVINHO, L. F.; BRITO, M. A. V. P.; BORGES, C. A. V.; GUIMARÃES, A.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; PICCOLI, R. H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected Brazilian dairy farms. *Veterinary Research Community*, v.40, p.97-106, 2016.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 77, n.3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. 2007. 1ªEd. São Paulo: Editora Manole p.47-64.

SANTOS, J. E. P.; BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; GRECO, L. F.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Society for Reproduction and Fertility*, v.67, p.387-403, 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, jul./ago. 2016

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

SAUER, K.; RICKARD, H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. *Microbe*, Washington, v.2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SEVERIN, A.; TABELI, K.; TENOVER, F.; CHUNG, M.; CLARKE, N.; TOMASZ, A. High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *Journal of Biological Chemistry* 2004. 279:3398-407.

SILVA, D.M. Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina. 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SOUZA, E. L.; MEIRA, Q. G.S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; CONCEIÇÃO, M. L.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiolog*, João Pessoa, v. 45, n. 1, p. 67-75, 2014.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNADINI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 848 p.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, Columbia, v. 40, p. 175-179, 2000.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; FRANKOWSKA, A.; KOT, B.; ZALEWSKA, M. Antibiotic resistance in staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: Lysostaphin, Nisin and Polymyxin B. *J. Vet. Med. Sci.* v.76(3), p.355-362, 2014.

TEIXEIRA, L. M.; SANTOS, K. R. N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5.ed. Ed.Atheneu, 2008. Cap. 20, p. 175-182.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2010. 67(3):419-31.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P.; HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science.* v. 96, n. 1, p. 234-246, 2013.

TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis,* v. 6, n. 156, 2006.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* v.45, n.6, p.763-70, 2000.

ULLAH, F.; MALIK, S.A.; AHMED, J.; ULLAH, F.; SHAH, S.M.; AYAZ, M.; HUSSAIN, S.; KHATOON, L. Investigation of the Genetic Basis of Tetracycline Resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* v. 11, n.; 6, p. 925-931, 2012.

WANG, H.; DING, S.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167:293-302

WEIGEL, L. M.; CLEWELL, D. B.; GILL, S. R.; CLARK, N. C.; MCDUGAL, L. K.; FLANNAGAN, S. E.; KOLONAY, J. F.; SHETTY, J.; KILLGORE, G. E.; TENOVER, F.C. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003;302:1569-71.

WHIST, A.C.; OSTERAS, O.; SOLVEROD, L. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. *Journal of Dairy Research.* Cambridge, v.76, p. 24-35, 2009.

WHO, 2007. World Health Organization, Food safety, Risk assessment. Available at: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskassessment/en/index.html> (Acesso em 20 de junho de 2018).

ZHANG, T.; ZHANG, M.; ZHANG, X.; FANG, H.H. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ Sci Technol.* 2009; 43(10):3455-60.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; Y.E, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*.v.8(7),2016.

YU, D.; ZHAO, L.; XUE, T.; SUN, B. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in a *icaR*-dependent manner. *BMC Microbiol*, London, n. 5, v.12, p. 288, 2012.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência – ACBS*, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.

ZENI, M.P.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R.; CARLI, E.M.; PALEZI, S.C. Influência dos microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. *Unoesc e Ciência – ACET*, v.4, n.1, p. 61-70, 2013.

ZOLI, J. A.; NEGRETE, I. R. A.; OLIVEIRA, T.C.R.M. 2002. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. *Higiene Alimentar*, 16, 62-70, 2002.

ARTIGO 1

Detecção de genes formadores de biofilmes, codificadores de enterotoxinas e de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite

SOARES, K.D.A.; VIANA, C.; CAMPOS, M.E.M; SOARES, C.E.A.; LIMA, A.dos A.; SILVA, T. M. S. S; LOPES, C.R.de A.; MELO, N.S.da S.; MEDEIROS, E. S. de; NERO, L. A.

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo detectar genes formadores de biofilmes, codificadores de enterotoxinas e de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite. Foram selecionadas 10 fazendas vinculadas à uma Indústria de beneficiamento de leite sob registro federal. As amostras de leite 960 animais 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*. Estes, foram submetidos a avaliação fenotípica de produção de biofilme, assim como a detecção de genes capazes de produzir biofilmes (icaA, icaD e Bap), genes que codificam as enterotoxinas (SeA, SeB, SeC, SeD, SeE), e genes relacionados a resistência (Tet(k), Vana). Foram encontradas 84,16% (134/152) amostras com gene BAP, 78,29% (119/152) com gene IcaD e apenas 1,32% (2/152) com gene IcaA. Não Foram encontradas as enterotoxinas Sea, Seb e Sed. Apenas as Sec em 17,76% (27/152) das amostras e See em 0,66% (1/152). Foram encontrados genes de resistência TetK em 48,68% (74/152), entretanto para VanA nenhum gene foi encontrado. Conclui-se com esse estudo que *Staphylococcus aureus* apresentaram genes formadores de biofilmes. E o teste de aderência para manifestação fenotípica da formação de biofilmes obteve grande relação com a presença de pelo menos um gene formador. Foram encontradas as enterotoxinas Sec e See nas cepas com forte capacidade de adesão para formação de biofilmes. Sugere-se maior controle profilático com práticas de higiene na ordenha para impedir a adesão de *S. aureus* no epitélio da glândula mamária e conseqüente formação de biofilmes, assim como maior controle na terapia nos casos da enfermidade.

Palavras chave: biofilmes, genes de resistência, enterotoxinas

ABSTRACT

The objective of this study was to detect biofilm-forming genes, enterotoxin coders and antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle with mastitis. Ten farms linked to a federally registered Milk Processing Industry were selected. Milk samples from 960 animals were submitted to microbiological examination. *Staphylococcus* spp. were selected and characterized for biochemical profile and presence of *femA* gene for identification of *S. aureus*. These were subjected to phenotypic evaluation of biofilm production, as well as the detection of genes capable of producing biofilms (*icaA*, *icaD* and *Bap*), genes encoding enterotoxins (*SeA*, *SeB*, *SeC*, *SeD*, *SeE*), and related genes. the resistance (*Tet (k)*, *Vana*). We found 84.16% (134/152) samples with *BAP* gene, 78.29% (119/152) with *IcaD* gene and only 1.32% (2/152) with *IcaA* gene. No *Sea*, *Seb* and *Sed* enterotoxins were found. Only *Sec* in 17.76% (27/152) of the samples and *See* in 0.66% (1/152). *TetK* resistance genes were found in 48.68% (74/152), however for *VanA* no genes were found. It is concluded from this study that *Staphylococcus aureus* presented biofilm forming genes. And the adherence test for phenotypic manifestation of biofilm formation was closely related to the presence of at least one gene formation. *Sec* and *See* enterotoxins were found in strains with strong adhesion capacity for biofilm formation. It is suggested greater prophylactic control with hygiene practices in milking to prevent adhesion of *S. aureus* in the mammary gland epithelium and consequent formation of biofilms, as well as greater control in therapy in cases of disease.

Key words: biofilms, resistance genes, enterotoxins

INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença plurietiológica e multifatorial, considerada uma das principais causas de perdas à indústria leiteira (VLIEGHER et al. 2012). Nesse contexto, *Staphylococcus aureus* se destaca dentre os microrganismos causadores de mastites de maior importância, maior ocorrência nos rebanhos mundiais e de difícil tratamento devido à elevada resistência aos antimicrobianos (MELO et al., 2012). Por este motivo as infecções causadas por este agente continuam sendo o maior problema para produção leiteira nas diversas regiões.

Staphylococcus aureus por ser altamente contagioso, ao infectar a glândula mamária, se adere ao epitélio e inicia a sua multiplicação, causando uma inflamação que resulta em alterações na aparência e consistência do úbere (MORITZ et al., 2017).

Diversos fatores de virulência, como exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares de *S. aureus*, já foram relatados em amostras isoladas de mastite bovina. Além disso, afirma-se que a formação de biofilme por estas cepas é também um importante fator de virulência que contribui para a sua patogênese por proporcionar ampla proteção em relação a resposta imunológica do hospedeiro e à ação dos antimicrobianos (MADIGAN et al., 2016).

A formação de biofilmes é considerada uma vantagem que alguns *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina possuem, facilitando a permanência dos mesmos no úbere (MELO et al., 2012). Segundo Yu et al. (2012), essa permanência é facilitada pelo mecanismo *quórum-sensing* que consiste num dos principais mecanismos de manutenção da atividade de um biofilme, isso ocorre devido a produção de moléculas sinalizadoras que aumentam em função da densidade populacional bacteriana.

Staphylococcus aureus também se destaca mundialmente pela capacidade de produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar (CRETENET et al. 2011). E o leite é um meio propício para o crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE). O grupo mais comum é formado por 5 sorotipos (Sea, Seb, Sec, Sed e See) que são responsáveis por 95% das intoxicações estafilocócicas (BERGDOLL E LEE WONG 2006), entretanto novos sorotipos já foram descritos, aumentando para 21 esse total (HENNEKINNE et al. 2010). As SEs são solúveis em água e altamente resistentes à atividade das maiorias das enzimas proteolíticas, tais como tripsina e pepsina o que mantém sua atividade biológica no tubo digestivo após ingestão (CRETENET et al. 2011).

Outro fator que vem ganhando destaque é o número crescente de estirpes de *S. aureus* resistentes às principais drogas utilizadas na medicina veterinária (MASSON, 2012). E isso se agrava ainda mais pelo uso indiscriminado de diferentes tipos de antimicrobianos no tratamento das mastites. A resistência aos antimicrobianos é um fator importante no estabelecimento e na disseminação de clones bacterianos em um rebanho (COSTA et al., 2013).

O monitoramento da resistência aos antibióticos vem sendo considerada parte importante na estratégia de controle da mastite e guia a seleção da terapia mais

apropriada e eficiente para infecções mamárias por *Staphylococcus* (JAGIELSKI et al., 2014). Objetivou-se com esse estudo detectar genes formadores de biofilmes, codificadores de enterotoxinas e de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

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.

Extração do DNA

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).

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Todos os isolados que apresentaram perfil fenotípico compatível com *S. aureus* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação pela detecção do gene *femA*, exclusivo dessa espécie (MEHROTRA et al., 2000). Os primers utilizados para detecção do gene *femA* estão descritos na Tabela 1, e o protocolo utilizado foi o descrito por Dias et al. (2011).

Tabela 1. Gene pesquisado e sequências de nucleotídeos dos primers das reações de PCR utilizadas para identificação de *S. aureus*.

Gene	Sequência	Produto (pb)
<i>fem A</i>	F - AAAAAAGCACATAACAAGCG R - GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132

- PCR com 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.

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* para a capacidade de formar biofilme

S. aureus foram submetidos a avaliação fenotípica de produção de biofilme de acordo com metodologia adaptada de Rodrigues et al. (2010). Cada cepa foi isolada em Caldo Tripton 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 (DO_{CN}) e comparada com a DO média dos isolados (DO_{IS}), sendo estes classificados como: negativo (DO_{IS}<DO_{CN}); fraco (DO_{CN}<DO_{IS}<2xDO_{CN}); moderado, (2xDO_{CN}<DO_{IS}<4xDO_{CN}); e forte (4xDO_{CN}<DO_{IS}) formadores de biofilmes (MERINO et al., 2009).

Técnica de Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

Foram selecionados 152 genes classificados fenotipicamente como forte e moderado produtores de biofilmes. Todos os genes pesquisados foram testados através de uma reação simplex da Polimerase em Cadeia. Para montar a reação o DNA foi mantido em gelo para descongelamento lento, bem como os pares de primer e o GoTaq® Green Master Mix – Promega (mistura contendo dNTPs, a Taq DNA polimerase e o MgCl₂). A reação foi montada para um total de 25 µL e compreendeu 12,5 µL de GoTaq®, 8,5 µL de água *Nuclease-Free*, 1 µL de cada *primer* e 2 µL do DNA. Após montada a reação, as amostras foram levadas ao termociclador onde

foram submetidas a variações de temperaturas por tempos determinados, de acordo com o primer utilizado.

A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 2% de gel de agarose corado com brometo de etídio. Foram utilizados marcadores de pesos moleculares que variaram de acordo com o gene pesquisado (tabela 2).

Tabela 2. Genes pesquisados e sequências de nucleotídeos dos primers das reações de PCR utilizadas

Gene	Primer	Sequência dos primers	Tamanho do produto (pb)
Sea	ESA-F	ACGATCAATTTTTACAGC	544
	ESA-R	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	
Seb	ESB-F	GAATGATATTAATTCGCATC	416
	ESB-R	TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	
Sec	ESC-F	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257
	ESC-R	AAATCGGATTAACATTATCCA	
Sed	SED-F	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317
	SED-R	TAATGCTATATCTTATAGGG	
See	SEE-F	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	170
	SEE-R	TAACTTACCGTGGACCCTTC	
Bap	BapF	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATG	971
	BapR	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCT	
icaA	icaAF	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	188
	icaAR	TCAGGCACTAACATCCAGCA	
icaD	icaDF	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198
	icaDR	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	
tetK	tetKF	GTAGCGACAATAGGTAATAGT	360
	tetKR	GTAGTGACAATAAACCTCCTA	
vanA	vanAF	ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G	399
	vanAR	TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G	

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas através do pacote RCommander do programa estatístico R, ao nível mínimo de significância de 0,05. Foram calculadas as frequências relativa e absoluta por gene, frequências simples e compostas e utilizados o teste exato de Fisher e o teste do qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que todos os 152 isolados de *Staphylococcus aureus*, classificados como forte (59,86%) e moderado (40,14%) produtores de biofilmes apresentaram genes *icaA*, *icaD* e *Bap*. Sendo 84,16% (134/152) de amostras com gene BAP, 78,29% (119/152) com gene *IcaD* e 1,32% (2/152) com gene *IcaA*. Em apenas uma amostra foi verificada a presença dos três genes relacionados a formação de biofilmes, esse isolado foi proveniente do estado de Pernambuco. A presença dos três genes neste isolado acarreta maior impacto em relação aos fatores de virulência, já que cada gene apresenta diferentes mecanismos relacionados a adesão e formação de biofilmes.

Mesmo sendo o gene menos frequente encontrado neste estudo, *IcaA* possui grande importância no contexto da mastite nos rebanhos. A presença do locus *ica* em isolados de mastite por *S. aureus* confirma seu potencial papel como fator de virulência na patogênese da mastite em ruminantes (MELO et al., 2013).

O gene *icaA*, assim como *IcaD*, estiveram presentes em 95,7% das estirpes de *S. aureus* isolados de casos de mastite subclínica, em pesquisa realizada por Melo et al. (2012), o que demonstra potencial ação de produção de biofilmes. Esses genes também foram relatados em 76,2% dos 20 isolados de *S. aureus* provenientes de cavidade oral em pacientes tunisistas (MERGHNI et al., 2015).

Segundo Kronung et al., (2016) a presença dos genes *IcaD*, confirma que os isolados têm potencial genético de formar biofilme. Isso foi confirmado com o maior percentual de gene *icaD* encontrado nas cepas com forte adesão na expressão fenotípica para formação de biofilmes (tabela 1).

Krewer et al. (2015) detectaram a presença do gene *icaD* em 92,2% dos 210 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de bovinos com mastite subclínica na região nordeste.

O gene Bap, encontrado com maior frequência neste estudo, está relacionado à *Staphylococcus aureus* causadores de mastite. Este gene pertence à um grupo de proteínas de superfície que promove adesão dos biofilmes. Segundo Marti et al., (2010), a formação de biofilmes mediada por proteínas in vivo é considerada importante fator de virulência para *Staphylococcus aureus*.

Bap foi o primeiro membro do grupo de proteínas de superfície que surgiu como um importante elemento no processo de formação de biofilme de diversas espécies bacterianas. Foi identificado em um isolado de *S. aureus* de amostras de mastite bovina, como sendo uma proteína essencial para a formação de biofilme (CUCARELLA et al., 2001).

Foi realizada uma associação entre a capacidade de formar biofilmes pelo método fenotípico e a presença de algum gene com capacidade formadora, observou-se diferença significativa pelo teste de Fisher entre os fortes e moderados formadores, ao nível mínimo de significância de 0,05 (tabela3).

Tabela 3. Associação entre a expressão da produção fenotípica de biofilmes e presença do gene formador.

Expressão fenotípica	Forte formador		Moderado formador		Total	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Genes						
Bap	15	62,5	9	37,5	24	100
IcaD	7	87,5	1	12,5	8	100
Bap e IcaD	61	56	48	44	109	100
Bap, IcaA e IcaD	1	100	0	0	1	100

FA: frequência absoluta; FR: Frequência relativa

Constatou-se que o teste de aderência em placas apresentou resultado significativo na expressão da produção fenotípica de biofilmes, o que foi confirmado pela presença dos genes. Isso indica a ótima relação entre os testes fenotípico e genotípico.

De acordo com Melo et al., (2012) o teste de aderência em microplacas fornece ótimo resultado na expressão da produção fenotípica de biofilme por estirpes de *Staphylococcus* spp. Segundo esses autores, trata-se de um teste recomendado para triagem da análise fenotípica, devido a sua alta sensibilidade e baixa especificidade.

Várias cepas *S. aureus* são produtoras enterotoxinas estafilocócicas (EE) em alimentos. Cinco EE clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as causas mais comuns de DTA por *S. aureus* (FEITOSA et al. 2017). Neste estudo, foram constatados apenas os genes Sec em 17,76% (27/152) das amostras e See em 0,66% (1/152). Correlacionando a presença destes genes com a manifestação fenotípica da produção de biofilmes pelo teste de aderência em placas, observou-se que o maior percentual das cepas que continham gene formador de enterotoxinas, expressaram forte aderência no teste fenotípico para formação de biofilmes (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre a expressão da produção fenotípica de biofilmes e presença de gene produtor de enterotoxinas.

Genes	Expressão fenotípica	Forte formador		Moderado formador		Total	
		FA	FR	FA	FR	FA	FR
Sec		18	66,7	9	33,3	27	100
See		1	100	0	0	1	100

FA: frequência absoluta; FR: Frequência relativa

O gene Sec foi o mais frequentemente encontrado nesse estudo, esse fato não corrobora com os dados encontrados por Acosta et al. (2017), que observaram o gene Sea com maior frequência, em 33,3% (9/27) das amostras de *S. aureus* provenientes de leite de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas. Nesse mesmo estudo, eles também não encontraram o gene que codifica a enterotoxina Seb, como foi observado nesta pesquisa. Esse achado é satisfatório, pois a toxina Seb é considerada uma arma biológica e sua inalação pode provocar lesões pulmonares e insuficiência respiratória (RAO et al. 2014).

O gene Sed também não foi encontrado, esse achado corrobora com diversas pesquisas em que esse gene também não foi identificado em isolados de *S. aureus* nos estudos realizados no nordeste (ALMEIDA et al. 2013, FERREIRA et al. 2014, SILVEIRA-FILHO et al. 2014).

A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos (HENNEKINNE et al., 2012).

Dos genes de resistência pesquisados, TetK foi encontrado em 48,68% (74/152) das cepas de *S. aureus*. Não se identificou o gene VanA.

Os genes tetK e tetM foram os mais encontrados em *S. aureus* (EMANEINI, et al., 2013). Hammad et al. (2012), detectaram em cepas de *Staphylococcus* spp., genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, aos beta-lactâmicos e tetraciclinas.

A resistência às tetraciclinas é principalmente por bombas de efluxo mediadas por tet (K) em *S. aureus* (ULLAH et al., 2012).

A resistência a determinado antimicrobiano pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana ou uma capacidade adquirida (CARVALHO et al., 2018).

A resistência aos antimicrobianos é resultado da adaptação dos microrganismos a pressão seletiva exercida por substâncias antagônicas de origem natural ou sintética presentes em seu meio (BLAIR et al., 2015). A resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos se dá por mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou até mesmo de espécies diferentes.

O desenvolvimento da resistência a antimicrobianos é um grande desafio para as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* na saúde animal, isso ocorre por essas bactérias estarem cada vez mais associadas à disseminação dos determinantes de resistência e às falhas terapêuticas, principalmente pela utilização indiscriminada de diferentes drogas no meio veterinário.

CONCLUSÃO

Conclui-se com esse estudo os genes de formação de biofilmes estão fortemente relacionados a capacidade de *Staphylococcus aureus* causarem mastites nos rebanhos. O teste de aderência para manifestação fenotípica da formação de biofilmes obteve grande relação com a presença de pelo menos um gene formador. Foram encontradas as enterotoxinas Sec e See, e a maioria delas estavam presentes nas cepas com forte capacidade de adesão para formação de biofilmes. O gene TetK foi o único encontrado para resistência antimicrobiana. Sugere-se maior controle profilático com práticas rotineiras para impedir a adesão de *S. aureus* no epitélio da

glândula mamária e consequente formação de biofilmes, assim como maior controle na terapia nos casos da enfermidade.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A.C.; SANTOS, S.J. dos; ALBUQUERQUE, L.; SOARES, K.D.A.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S. Frequência de genes codificadores de toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques expansão comunitários. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(7):691-696, 2017.

ALMEIDA, L.M.; DE ALMEIDA, M.Z.P.; MENDONÇA, C.L.D.; MAMIZUKA, E.M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44:493-498. 2013.

BERGDOLL, M.S. WONG, A.C.L. Staphylococccal intoxications, In: Cliver, D., Potter, M., Riemann, H.P. **Foodborne Infections and Intoxications**.3ed. Califórnia: Academic Press, 2006. p. 523-556.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, v. 13, p. 42- 51, 2015.

CARVALHO, A.S.S.; SERRA, J.L.; RODRIGUES, L da C.; RODRIGUES JÚNIOR, I de s.; MOUCHREK, A.N.; FERREIRA, E.M. Susceptibilidade de staphylococcus aureus isolados de leite cru a antibióticos comerciais. *Ciencia Animal Brasileira*, Goiânia, v.19, 1-8, e-47159, 2018.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arquivo Instituto de Biologia*, São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. Technol.* 91:127-150.

CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., PENADES, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 183, 2888–2896.

DIAS, N.L., SILVA, D.C.B., OLIVEIRA, D.C.B.S, FONSECA JUNJIOR, A.A., SALES, M.L., SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n.6, p.1547-1552,2011.

EMANEINI, M.; BIGVERDI, R.; KALANTAR, D.; SOROUSH, S.; JABALAMELI, F.; KHOSHGNAB, B.N.; ASADOLLAHI, P.; TAHERIKALANI, M. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. [Ann Burns Fire Disasters](#). 30; 26(2): 76–80, 2013.

FEITOSA, A.C.; RODRIGUES, R.M.; TORRES, E.A.T.; SILVA, J.F.M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. *Revista Desafios* – v. 04, n. 04, 2017

FERREIRA, D.H.; CARVALHO, M.G.X.; NARDELLI, M.J.; SOUSA, F.G.; OLIVEIRA, C.J. 2014. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. *Pesq. Vet. Bras*. 34:633-636.

HAMMAD, A.M.; WATANABE, W.; FUJII, T. SHIMAMOTO, T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology*, v. 3, p. 286-289, 2012.

HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.L.; DRAGACCI, S. 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins* 2:2106-2116.

HENNEKINNE, J.-A.; BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *N.Z. Vet. J.* 59(1):16-23.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A.; SIEDLECKI, P.; DUDZIAK, W.; MIEDZOBRODZKI, J.; KRUKOWSKI, H. Short communication: Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. *J. Dairy Sci.* v.97, p.6122-6128,2014.

KREWER, C.C., AMANSO, E.S., GOUVEIA, G.V., SOUZA, R.L., COSTA, M.M., MOTA, R.A., 2015. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in

Staphylococcus spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 47, 511-518.

MAGIGAN, M. T.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D. *Microbiologia de Brock*. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 2016. 1006 p.

MARTI, M.; TROTONDA, M. P.; TORMO-MAS, M. A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A. L.; LASA, I.; PENADES, J. R. Extracellular proteases inhibit protease-independent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 55-64, 2010.

MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G.S.; CARVALHO, L.F.O.S. Perfil de Resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* Isolados de Granjas e Frigoríficos de Suínos. *Archives of Veterinary Science*, v. 17, n.1, p. 1-14, 2012.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, 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.

MELO, P. de C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*. Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G.; SOUZA, V. Comparação de métodos para detecção de formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. 2013. *Revista Brasileira de Microbiologia*. v.24, n.1.

MERGHNI, A.; NEJMA, M. B.; HELALI, I.; HENTATI, H.; BONGIOVANNI, A.; LAFONT, F.; MAHJOUR AOUNI, M.; MASTOURI, M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogenesis*, London, v. 86, p. 1-9, 2015.

OLIVEIRA, C. M.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 31 n. 2 Rio de Janeiro Fev. 2011.

RAO, R.; NAGARKATTI, P.; NAGARKATTI, M. 2014. Staphylococcal enterotoxin B-induced MicroRNA-155 Targets SOCS1 to promote acute inflammatory lung injury. *Infect. Immun.* 82:2971-2979.

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

SILVEIRA-FILHO, V.M.; LUZ, I.S.; CAMPOS, A.P. F.; SILVA, W.M.; BARROS, M.P.S.; MEDEIROS, E.S.; FREITAS, M.F. L.; MOTA, R.A.; SENA, M.J.; LEAL-BALBINO, T.C. 2014. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in Northeast Brazil. *J. Food Protect.* 77:583-591.

VLIEGHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, S.; BARKEMA, H.W. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95:1025-1040.

YU, D.; ZHAO, L.; XUE, T.; SUN, B. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in a *icaR*-dependent manner. *BMC Microbiol*, London, n. 5, v.12, p. 288, 2012.

ARTIGO 2

Ação de desinfetantes utilizados na ordenha sobre biofilmes em formação e consolidado de *Staphylococcus aureus* obtidos do leite de vacas com mastite subclínica

SOARES, K.D.A.; VIANA, C.; CAMPOS, M.E.M; SOARES, C.E.A.; LIMA, A.dos A.;
SILVA, T. M. S. S; ALVES, E.S. do A; MELO, N.S.da S.; MEDEIROS, E. S. de;
NERO, L. A.

RESUMO

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. Foram selecionadas 10 fazendas vinculadas à uma Indústria de beneficiamento de leite sob registro federal. As amostras de leite 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*. Estes, foram submetidos a avaliação fenotípica de produção de biofilme. Foi avaliada a ação de dois desinfetantes utilizados no pré e pós dipping a base de clorexidine (2%) e ácido láctico (2%), sobre biofilmes em formação e consolidados de 86 isolados de *Staphylococcus 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 clorexidine 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 clorexidine conseguiu reduzir 43% do biofilme consolidado. 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 expressiva para o produto à base de clorexidine. 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*.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, biofilmes desinfetantes

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the action of disinfectants used in milking on forming and consolidated biofilms of *Staphylococcus aureus* obtained from milk of cows with subclinical mastitis. Ten farms linked to a federally registered Milk Processing Industry were selected. Milk samples from 960 animals with subclinical mastitis were submitted to microbiological examination. *Staphylococcus* spp. were selected and characterized for biochemical profile and presence of femA gene for identification of *S. aureus*. These were submitted to phenotypic evaluation of biofilm production. The action of two chlorhexidine (2%) and lactic acid (2%) disinfectants used on pre and post dipping based on forming and consolidated biofilms of 86 isolates of *Staphylococcus aureus*, which were initially phenotypically classified as strong and moderate biofilm producers. Excellent reduction rate was observed for biofilm in formation, in this context lactic acid showed better results, with 100% reduction, while for chlorhexidine 94.2% were observed. For the consolidated biofilm the percentage of action was much lower, lactic acid showed low efficacy over the biofilm already formed, with 3.5% reduction rate, while chlorhexidine was able to reduce 43% of the consolidated biofilm. It is concluded with this study that the tested products presented high reduction in the adhesion rate of all isolates. However, the action on the consolidated biofilms was more expressive for the chlorhexidine product. There is a need for the elaboration and use of disinfectants that act on both isolated microorganisms and biofilms. In addition, there is a need for more rigorous milking management programs to control mastitis and prevent adhesion and formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, disinfectant biofilms

INTRODUÇÃO

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária, de origem pluri-etiológica e multifatorial, é uma enfermidade 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 de leite e a afecção mais onerosa para pecuária leiteira (ACOSTA et al., 2016).

Staphylococcus spp. se destacam entre os microrganismos mais comumente relacionados a ocorrência desta enfermidade (BANDOCH; MELO, 2011), além disso, estão frequentemente associados à infecções mediadas por biofilme, por ser um microrganismo comensal, encontrado na pele, narinas e mucosas e que pode se tornar fonte de infecções graves (GIL et al., 2014).

S. aureus causadores de mastite, possuem 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 de teto pré-existentes. 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).

Miguel et al. (2012) comparam a higienização dos tetos feita apenas com água à realizada por pré-dipping e a não realização de qualquer higienização, e

demonstram a necessidade de realização do pré-dipping, levando em conta a diminuição, na produção, de micro-organismos após sua prática. Além disso, evidenciam a indispensabilidade de uma limpeza correta das ordenhadeiras, considerando seu papel na disseminação da infecção.

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.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

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.

Extração do DNA

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).

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Todos os isolados que apresentaram perfil fenotípico compatível com *S. aureus* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação pela detecção do gene *femA*, exclusivo dessa espécie (MEHROTRA et al., 2000). Os primers utilizados para detecção do gene *femA* estão descritos na Tabela 1, e o protocolo utilizado foi o descrito por Dias et al. (2011).

Tabela 1. Gene pesquisado e sequências de nucleotídeos dos primers das reações de PCR utilizadas para identificação de *S. aureus*.

Gene	Sequência	Produto (pb)
<i>fem A</i>	F - AAAAAAGCACATAACAAGCG R - GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132

- PCR com 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.

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* para a capacidade de formar biofilme

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 Tripton 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 (DO_{CN}) e comparada com a DO média dos isolados (DO_{IS}), sendo estes classificados como: negativo (DO_{IS}<DO_{CN}); fraco (DO_{CN}<DO_{IS}<2xDO_{CN}); moderado, (2xDO_{CN}<DO_{IS}<4xDO_{CN}); e forte (4xDO_{CN}<DO_{IS}) 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.

Avaliação da eficácia de desinfetantes sobre o biofilme em formação e biofilme consolidado

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.

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. Os resultados para o biofilme consolidado foram expressos em: **Não redutor**, quando o percentual da redução da aderência foi igual a 0; **fraca** redução quando a ação do desinfetante foi capaz de reduzir em até 35% o biofilme; **moderada** redução se o percentual encontrado foi entre 35% e 70%; e **forte** redução quando esse percentual foi superior à 70%.

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 (Tabela 2). 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.

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).

Outras vantagens da utilização desse desinfetante é sua efetividade contra a maioria das bactérias, vírus e esporos e a ausência de toxicidade, além disso, o seu efeito cumulativo e contínuo, facilita a permanência na pele do teto. Clorexidine sempre foi bastante utilizado no pré e pós- *dipping* por possuir amplo espectro de ação e não ser inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica, como sangue, leite, pus e fluidos teciduais (MARGATHO et al., 2014).

Santos et al. (2018) relatam a clorexidine como desinfetante que proporcionou a maior taxa de redução da carga de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

coagulase positiva e negativa presentes no teto de animais em estudo realizado na região de Nova Tebas-PR.

Lopes et al. (2013) mostraram que, para diferentes micro-organismos, clorexidine está entre os desinfetantes de escolha, dada a alta sensibilidade de diferentes cepas, incluindo cepas de *Staphylococcus* spp.

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 (Tabela 2).

Tabela 2. Interferência de clorexidine e ácido láctico sobre o biofilme em adesão

CAPACIDADE DE FORMAR BIOFILMES		ADERÊNCIA DO BIOFILME EM FORMAÇÃO					
Classificação	n° amostras	Clorexidine 2%			Ácido láctico 2%		
		Sem aderência	Fraca	Moderada	Sem aderência	Fraca	Moderada
FORTE	44	36,35% (16/44)	52,3% (23/44)	11,35% (5/44)	77,3% (34/44)	22,7% (10/44)	-
MODERADO	42	23,8% (10/42)	64,3% (27/42)	11,9% (5/42)	90,5% (38/42)	9,5% (4/42)	-
TOTAL	86	30,2% (26/86)	58,1% (50/86)	11,6% (10/86)	83,7% (72/86)	16,3% (14/86)	-

Sabendo da capacidade de *Staphylococcus aureus* para se aderir ao teto e formar biofilme, 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 clorexidine (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).

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 (tabela 3).

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). Peixoto et al. (2015) observou essa maior resistência de *Staphylococcus coagulase* positiva, frente aos desinfetantes utilizados (clorexidina e iodo), no qual, praticamente não se observou redução da biomassa do biofilme. No entanto, no mesmo estudo, observaram que, tanto o clorexidina quanto o iodo, apresentaram um efeito significativo na redução do biofilme formado por *Staphylococcus Coagulase* Negativa.

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 e ser responsável pelos danos mais agressivos ao rebanho, nos quais os animais não respondem bem ao tratamento.

O surgimento de microrganismos resistentes pode estar associado ao uso excessivo de produtos desinfetantes em utensílios e como sanitizantes de tetos (MORÃO et al., 2015)

Segundo Freire et al. (2018) é urgente e necessária a busca por novas alternativas viáveis para o desenvolvimento de antimicrobianos que busquem controlar ou eliminar a resistência provocada pelos biofilmes.

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.

Tabela 3. Interferência de clorexidine e ácido láctico sobre o biofilme Consolidado

CAPACIDADE DE FORMAR BIOFILMES		REDUÇÃO DA ADERÊNCIA DO BIOFILME CONSOLIDADO							
Classificação	n° amostras	Clorexidine 2%				Ácido láctico 2%			
		Não redutor	Fraca	Moderada	Forte	Não redutor	Fraca	Moderada	Forte
FORTE	44	56,8% (25/44)	29,5% (13/44)	9,1% (4/44)	4,5% (2/44)	97,7% (43/44)	2,3% (1/44)	-	-
MODERADO	42	57,1% (24/42)	28,6% (12/42)	9,5% (4/42)	4,8% (2/42)	95,2% (40/42)	4,8% (2/42)	-	-
TOTAL	86	57% (49/86)	29,1% (25/86)	9,3% (8/86)	4,6% (4/86)	96,5% (83/86)	3,5% (3/86)	-	-

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 clorexidine. 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*, 2016, 36, 565-573.

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.

BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. *Publicatio UEPG: Biological and Health Sciences*, Ponta Grossa, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011.

BARLOW J. 2011. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16:383-407.

FREIRE, N. B.; PIRES, C. S. R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. 2018. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(2):244-249.

GIL, C.; SOLANO, C.; BURGUI, S.; LATASA, C.; GARCIA, B.; TOLEDO-ARANA, A.; LASA, I.; VALLE, J. Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infection and Immunity*. 82(3): 1017-29, 2014.

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.

MARGATHO, L.F.F.; PEDRINI, S,C,B,; CURCI, V.C.M. Mastite bovina e o uso de antissépticos. *Pesquisa e Tecnologia*, vol. 11, n. 1, 2014.

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, 470–476, 2010.

MARTINS, P.D.; ALMEIDA, T.T. de; BASSO, A.P.; MOURA, T.M. de; 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.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? Review. *The Veterinary Journal*, Janeiro, 2005.

MELO, P. C. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. 2008.

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 multicelular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n.3, p. 832-843, 2009.

MIGUEL, P. R. R., et al. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012.

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

MORÃO, R. P.; COSTA, A.C.M.S.; ALMEIDA, A.C.; OLIVEIRA, N.J.F; MARTINS, E.R. Produtos convencionais e extratos de plantas medicinais utilizados na higienização de tetos de bovinos leiteiros. 2015. *Caderno de Ciências Agrárias*. v.7, n. 1.

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.133-40, 2006.

OLIVEIRA, M. R. M. de; MEDEIROS, M. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. *Revista Científica de Medicina Veterinária – FACIPLAC*. V. 2, n.1, 2015.

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, 35(2): 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.

QUINN, P. J., M. E. CARTER, B. MARKEY AND G. R. CARTER. 1994. Clinical Veterinary 373 Microbiology. Wolfe, London, UK.

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, 32(12):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. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Braz. J. Microbiol. 41:1082- 1085.

SAMPAIO, I.B.M. 1998. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. UFMG, Belo Horizonte. 221p.

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, jul./ago. 2016

SANTOS, I.C. dos; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.F. de; OLIVEIRA, V.R. de; MARTINS, L. de a. 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.; D. O. NOORLANDER. 1957. Experiments and observations leading to 381 development of the California mastitis test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130:199–204.

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*, 2013, 7, 26-31.

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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus aureus, agente da mastite infecciosa bovina, em condições favoráveis conseguem se aderir ao teto do animal e formar biofilmes, estes, quando formados, possuem elevado poder de resistência. O que interfere na ação de diversos agentes desinfetantes que são utilizados para o controle da mastite nos rebanhos.

Foi observado elevado grau de redução da adesão dos biofilmes pela ação dos desinfetantes testados nesse estudo. Sugere-se a implantação de medidas preventivas no manejo de ordenha para diminuir as chances da aderência e consequente formação de biofilmes por agentes causadores da mastite nos rebanhos, assim como a investigação de produtos mais eficazes, que atuem tanto nas células bacterianas livres, como nos microrganismos na forma de biofilmes, para que assim diminua a ocorrência dessas estruturas resistentes, garantindo a sanidade do rebanho.