ALESSANDRA MÓDENA ORSI

Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina

Pirassununga

2017

ALESSANDRA MÓDENA ORSI

Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina

Dissertação apresentada no Programa de Pós – Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3445
FMVZ

Orsi, Alessandra Módena
Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina. / Alessandra Módena Orsi. – 2016.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Capacidade de formação de biofilme. 2. Susceptibilidade aos antimicrobianos e multirresistência. I. Título.

Certificado comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Capacidade de formação de biofilme e resistência a antimicrobianos por patogênos causadores de mastite", protocolada sob o CEUA nº 5301031014, sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/10/2016.

We certify that the proposal "Capacity of biofilm formation and antibiotic resistance by mastitis pathogens", utilizing 800 Bovines (800 females), protocol number CEUA 5301031014, under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/27/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2014 a 12/2015 Área: Nutrição E Produção Animal

Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	24 a 76 meses	N:	800
Linhagem:	Holandês			Peso:	500 a 800 kg		

Resumo: Mastite é uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias. Essa doença pode apresentar forma subclínica onde o animal não apresenta sintomas visíveis e forma clínica onde ocorrem sintomas visíveis. A mastite subclínica é a forma mais prevalente causadora de grandes prejuízos, pois causa diminuição da produção de leite e aumenta a contagem de células somáticas. Staphylococcus aureus é um patógeno primário, causador de mastite de caráter crônico intermitente e resistente a tratamentos antimicrobianos por fatores de virulência sendo um deles a capacidade de produção de biofilme. Dentre os patógenos secundários se destacam o Streptococcus uberis que assim como o sta. aureus possui fatores de virulência sendo um deles a produção de biofilme. O biofilme bacteriano é definido como produção de matriz extra celular composta por polissacarídeos, proteínas e DNA que possibilita, a adesão e proteção de micro-organismos em superfícies orgânicas e inorgânicas . O método de microplacas possibilita a identificação de forma rápida dos isolados produtores de biofilme. O procedimento utilizado para teste de resistência à antimicrobianos será o teste de disco difusão em Agar Mueller Hinton que fornece informações sobre susceptibilidade microbiana in vitro. Os testes de susceptibilidade ajudam na utilização do antimicrobiano correto para combater os agentes causadores de mastite. A identificação a nível de sub- espécie pelo método (RAPD-PCR) vai possibilitar a correlação entre produção de biofilme, sub- espécie e resistência à antimicrobianos. A resistência a antimicrobianos é um problema de grande impacto na pecuária leiteira em todo o mundo. Conhecer os fatores de virulência tais como a produção de biofilme resistência antimicrobianos e correlacionar com as diferente sub-espécies desse isolados é de extrema importância para o avanço no controle e tratamento de mastite.

Local do experimento: Foi utilizado amostras provenientes do banco de bactérias do laboratório Qualileite. O experimento foi realizado no laboratório qualileite.

São Paulo, 31 de outubro de 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ORSI, Alessandra Módena

Título: Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr._____
Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____Julgamento:_____

DEDICATORIA

Dedico esse trabalho ao meu amor, amigo e companheiro Marcos André Areari

AGRADECIMETO

Á Deus criador de tudo, sem ele nada seria possível.

Aos Orixás e Guias que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida me apoiando, iluminando e guiando meus caminhos.

A minha família, minha mãe Sandra, meu irmão Estevam e minha cunhada Carol e minha Avó Regina pelo apoio paciência, compressão e amor dedicados a mim.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório Qualileite Bruna, Danielle, Renata, Cristian, Katiele, Eduardo, Juliana, Juliano, Camylla, Cristina, Susana, Melina e Lucinéia pela boa convivência e amizade. E um forte agradecimento aos que trabalham diretamente ao meu trabalho Tiago, Ana Carolina, Larissa, Eduarda, Gabriel, Gabriel (Costa Rica), Zeca e Carlos obrigada pela amizade pelo apoio e trabalho, melhor equipe impossível.

Ao Prof. Marcos Veiga dos Santos pela confiança no meu trabalho e por ter nesses 4 anos de convívio

Aos secretários João Paulo, Alessandra, Fábia e Dona Lúcia, Dona Lurdes por todo apoio no departamento. Os funcionários da limpeza que sempre colaboraram com a limpeza do laboratório e ao meninos da segurança por todo apoio muito obrigada.

Ao Prof. José Luís Moraes de Vasconcelos (Zequinha) e sua esposa Carla por sempre ter me incentivado e apoiado desde a graduação, meu sincero e forte agradecimento e admiração.

Ao Prof. Paulo Domingues (Paulinho) por ter também me apresentado ao mundo da microbiologia, pelo carinho, confiança e amizade meu sincero agradecimento.

Á todos da minha família espiritual do Templo Umbanda Caboclo Tupinambá e Vovó João de Angola em especial ao Pai Luiz e a Amanda

Ao Asilo Nossa Senhora de Fátima pela oportunidade de realizar trabalho voluntário na horta para os idosos e a minha amiga Maria Fernanda que nós ajudou durante esse período.

Aos amigas Daniela e Raíza por todo apoio nas horas difíceis e amizade dedicados a mim.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

Orsi, A. M. **Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina.** [Biofilm-forming ability and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* causing bovine mastitis]. 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Staphylococcus aureus e *Streptococcus uberis* são dois patógenos causadores mastite bovina que podem apresentar capacidade de produção de biofilme, o que pode resultar em infecções intramamárias crônicas, menor resposta à terapia, redução de produção de leite e maior risco de descarte das vacas infectadas. Os objetivos deste estudo foram avaliar a: 1) capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* e *S. uberis* isolados de vacas com mastite clínica (MC) e subclínica (MSC); 2) sensibilidade *in vitro* e a multirresistência destes agentes a antimicrobianos selecionados (n=12); 3) associação entre a capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* e *S. uberis*. Um total de 197 cepas *S. aureus* e 128 *S. uberis* foram isoladas a partir de amostras de leite de vacas com MSC e MC, oriundas de 24 rebanhos. Os isolados de *S. aureus* e *S. uberis* foram avaliados quanto a capacidade de formação de biofilme pelo método??? e a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de disco difusão em ágar. A capacidade de formação de biofilme foi classificada em 4 categorias: forte, moderado, fraco e não formador de biofilme. Do total de cepas avaliadas, *S. aureus* (54,8%) e *S. uberis* (52,9%) apresentaram capacidade de formação de biofilme (forte, moderado ou fraco). Entre os isolados de *S. aureus* formadores de biofilme, a frequência de distribuição dos isolados foi de 19,3% na categoria forte, 18,8% moderado, e 16,7% na categoria fraco. Para os isolados de *S. uberis,* a frequência de distribuição entre as categorias de formação de biofilme foi 17,6% forte, 25,2% moderado, 17,6% fraco. Dentre as cepas de *S. aureus* isoladas de casos de MC, 55,8% foram classificados como forte formador de biofilme, enquanto 7,6% das cepas isoladas de MSC apresentaram capacidade de formação de biofilme. Todos os isolados de *S. uberis* (n=30; 100%) provenientes de MC apresentaram capacidade de formação de biofilme na categoria moderado. Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, os isolados de *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina (92,9%), ampicilina (50,8%) e tetraciclina (18,3%); e os isolados de *S. uberis* apresentaram resistência à penicilina (86,5%), oxacilina (85,5%), tetraciclina (37,5%). Os isolados de *S. aureus* apresentaram maior chance de resistência aos antimicrobianos ampicilina, tetraciclina e ceftiofur que *S. uberis*. Em conclusão, *S. aureus e S. uberis* apresentam elevada capacidade de produção de biofilme, mas não houve interação entre a característica de multirresistência e formação de biofilme. Isolados de *S. aureus e S. uberis* foram altamente resistentes aos antimicrobianos das classes de beta-lactâmicos e tetraciclinas.

Palavras chave: capacidade de formação de biofilme, susceptibilidade aos antimicrobianos e multirresistência.

ABSTRACT

Orsi, A.M. **Biofilm-forming ability and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* causing bovine mastitis.** Capacidade de formação de biofilme e resistência à antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina.]. 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Staphylococcus aureus and *Streptococcus uberis* are both mastitis causing pathogens that can present ability to produce biofilm, which can result in chronic intramammary infection, reduced response to the therapy, reduction of milk yield, and greater risk of cows' culling. The objectives of this study were to evaluate the: 1) biofilm-forming capacity of *S. aureus* and *S. uberis* isolated from clinical (CM) and subclinical mastitis (SCM); in vitro sensibility and multi-resistance of these agents to the antimicrobials; 3) association between the biofilm-forming capacity and antimicrobial resistance. A total of 197 *S. aureus* and 128 *S. uberis* were isolated from milk samples collected from cows with SCM and CM from 24 dairy herds. The biofilm-forming ability were classified in 4 categories: strong, moderate, weak, and non-biofilm producers. Of all isolates evaluated, *S. aureus* (54.8%) and *S. uberis* (52.9%) presented biofilm-forming ability (strong, moderate or weak). Among the biofilm-forming isolates, the frequency of distribution of *S. aureus* was 19.3% for the strong, 18.8% for the moderate, and 16.7% for the weak categories. For the *S. uberis* isolates, the frequency of distribution among the biofilm-forming categories was 17.6% strong, 25.2% moderate, and 17.6% weak. In relation to the mastitis presentation form, the strong biofilm-forming category had 55.8% of *S. aureus* isolates from CM cases; and among all biofilm-forming categories, the strong category was the one with the higher number of isolates of *S. aureus* (n=43; 19,2%). All *S. uberis* isolates (n=30; 100%) from CM presented moderate biofilm-forming ability. In relation to the antimicrobial susceptibility, the isolates of *S. aureus* were resistant to penicillin (92.9%), ampicillin (50.8%) and tetracycline (18.3%); and the isolates of *S. uberis* presented resistance to penicillin (86.5%), oxacillin (85.5%) and tetracycline (37.5%). The isolates of *S. aureus* and *S. uberis*, *S. aureus* had higher odds to be resistant to ampicillin, tetracycline and ceftiofur than *S. uberis*. In conclusion, *S. aureus* and *S. uberis* presented high ability of production of biofilm, but there was no interaction between multi-resistance and biofilm production ability. Isolates of *S. aureus* and *S. uberis* were highly resistant to antimicrobials of the class of beta lactams and tetracycline.

Key words: biofilm-forming ability, antimicrobial susceptibility and multi-resistance.

LISTA DE TABELA

TABELA 1 Tabela de interpretação dos halos de inibição conforme a tabela M31-A3 do CLSI.....24

TABELA 2 Frequência da capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* e *S. uberis* isolados de mastite clínica esubclínica.....26

TABELA 3 Distribuição da susceptibilidade "in vitro" aos antimicrobianos de *S. aureus* e *S. uberis* isolados de mastite bovina 27

TABELA 4 Efeito da capacidade de formação de biofilme, tipo de mastite (MC e MSC) e patógeno causador (*S. aureus* e *S. uberis*) com a resistência e multirresistência aos antimicrobianos: Parte 1: Valores de P.....28

TABELA 5 Efeito da capacidade de formação de biofilme, tipo de mastite (MC e MSC) e patógeno causador (*S. aureus* e *S. uberis*) com a resistência e multirresistência aos antimicrobianos: Parte 2: Médias.....29

TABELA 6 Frequência de classes de antimicrobianos e distribuição das categorias de biofilme.....30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Etapas da formação de biofilme.....8

FIGURA 2 Mecanismos de resistência à antimicrobianos em biofilme.....24

FIGURA 3 Teste de disco difusão em ágar.....29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Hearth Infusion
CAMP	Christie, Altkins e Munch Pertersen
CCS	Contagem de células somáticas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EPS	Expolissacarídeos
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diaseses
FORTE	Forte produtor de biofilme
FRACO	Fraco Produtor de biofilme
IIM	Infecção Intramamária
MALDI/TOF – MS	Espectrometria de massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
MC	Mastite Clínica
MSC	Mastite Subclínica
MODERADO	Moderado produtor de biofilme
NMC	National Mastitis Council
NP	Não produtor de biofilme
OD	Densidade ótica
PIA	Polissacarídeos intracelulares adesinas
TSB	Caldo de tripcase soja
µL	Microlitro
µg	Micrograma

Sumário

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 Classificação dos principais agentes causadores de mastite 16
2. 2. Impacto econômico da mastite 20
2.3. Biofilmes bacterianos 21
2.4. Terapia antimicrobiana e resistência bacteriana 24
2.5. Características etiológicas e epidemiológicas relacionadas ao *Staphylococcus aureus* como agente causador de IIM 30
2.6 Características etiológicas e epidemiológicas relacionadas ao *Streptococcus uberis* como agente causador de IIM 32
3. MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1. Cultura microbiológica 35
3.2. Identificação bacteriana por MALDI TOF – MS 36
3.3. Formação de biofilme em microplacas de polietileno 37
3.4. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos 37
3.5. Análise estatística 40
4. RESULTADOS 41
4.1 Capacidade de formação biofilme 41
4.2. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos e multirresistência 42
5. DISCUSSÃO 46
6. CONCLUSÃO 52
7. REFERÊNCIAS 53

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença que causa grandes prejuízos para o setor de produção de leite. Esta doença causa o dobro de perdas econômicas em comparação aos custos relacionadas à infertilidade e doenças reprodutivas (PHILPOT e NICKERSON, 2002). A mastite é uma inflamação da glândula mamária, causada principalmente por bactérias, e que pode se apresentar nas formas clínica e subclínica.

Dentre os agentes etiológicos causadores da mastite, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* destacam-se como causas de infecções intramamárias crônicas e que resultam em aumento da contagem de células somáticas (CCS) do leite. Atualmente, estes agentes têm sido bastante estudados em relação aos mecanismos de transmissão, variabilidade genética, resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência (BRADLEY et al., 2014). *Staphylococcus aureus* é um patógeno primário e contagioso, com potencial em causar infecções crônicas, alta além de apresentar elevada resistência aos tratamentos com antimicrobianos e capacidade de produção de biofilme (FOX et al., 2005). Portanto, infecções intramamárias causadas por este patógeno geralmente resultam em elevadas perdas econômicas. Entre os prejuízos causados por este agente, destacam-se a redução de produção de leite das vacas infectadas, o descarte prematuro de animais, e as baixas taxas de cura com o uso de antimicrobianos durante a lactação, mesmo em tratamentos com período estendido (ROY et al., 2009, SWINKELS et al., 2013).

Outro patógeno com potencial em causar prejuízos expressivos à cadeia produtiva do leite é *Streptococcus uberis*, o qual é considerando um agente causador de mastite ambiental, porém, podendo ter transmissão contagiosa (de vaca para vaca). Também é frequentemente encontrado em infecções subclínicas no início (MCDOUGALL, 1998) e no final da lactação (WILLIAMSON et al., 1995). Além disso, *S. uberis* é um agente que também apresenta capacidade de formar biofilme (VARHIMO et al., 2011). Os mecanismos de aderência e internalização nas células epiteliais da glândula mamária são eventos importantes para o estabelecimento de infecções por *S. uberis*, e a formação de biofilme dependente da capacidade do microrganismo em se aderir às células epiteliais da glândula mamária (ALMEIDA, et al., 2006).

O biofilme bacteriano é formado por comunidades complexas de microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semi-sólidas envoltas por uma matriz de expolissacarídeos (EPS) (CONSTERTON et al., 1995). A formação de biofilme atua como uma camada protetora onde os microrganismos continuam se multiplicando e podem ser liberados ocasionalmente ao

meio externo ao biofilme, o que resulta em potencial formação de novas comunidades de biofilmes, além de conferir aos microrganismos uma proteção contra fatores ambientais como a dessecação (SUTHERLAND, 2001). A matriz de EPS fornece também proteção contra agentes antimicrobianos, pois limita o contato direto do antimicrobiano com os microrganismos (STEWART, 1996).

A mastite é a doença que mais demanda o uso de antimicrobianos para tratamentos na lactação e secagem (POL e REUGG 2007). Em razão da alta demanda de antimicrobianos para o tratamento de infecções intramamárias em vacas leiteiras, há uma crescente preocupação com a disseminação de resistência aos antimicrobianos(BARLOW, 2011), pois o uso de antibióticos na produção animal pode contribuir para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos usados em medicina humana (OLIVER et al., 2011). Alguns países da União Europeia já adotaram medidas para reduzir o uso de antimicrobianos na produção visando a diminuição do risco de propagação desta possível resistência cruzada entre patógenos de origem animal e humana (EFSA, 2011).

As hipóteses desse estudo são, 1) *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina apresentam alta capacidade de formação de biofilme; 2) isolados com capacidade de formação de biofilme são mais resistentes *in vitro* aos antimicrobianos *in vitro*; 3) os isolados formadores de biofilme apresentam maior chance de ser multirresistentes que isolados não formadores de biofilme. Portanto, este estudo objetivou avaliar a: 1) capacidade de formação de biofilme de *S. aureus* e *S. uberis* isolados de casos de mastite clínica (MC) e subclínica (MSC); 2) sensibilidade *in vitro* e a multirresistência destes patógenos a 12 antimicrobianos; e, 3) associação entre a capacidade de formação de biofilme e a resistência aos antimicrobianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação dos principais agentes causadores de mastite

Mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente causada pela infecção por diversos tipos de microrganismos, sendo as bactérias os principais causadores. (BRITO et al., 2005). Vacas com infecção intramamária (IIM) apresentam um aumento no número de células inflamatórias de defesa, passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos, linfócitos, enquanto o número de células epiteliais permanece inalterado (PHILPOT e NICKERSON, 1991).

A reação inflamatória é um mecanismo de defesa desencadeado pelo organismo animal para eliminar o microrganismo patogênico, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite para que a glândula possa voltar à sua função fisiológica. O grau de inflamação pode variar desde um quadro subclínico ao clínico, dependendo da reação inflamatória contra o agente infeccioso. As perdas no potencial de produção pode sofrer influência de diversos fatores como: gravidade da infecção, tipo de micro-organismo causador, duração da infeção, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

A mastite bovina pode ser causada por uma variedade de agentes, incluindo bactérias, leveduras, fungos e algas. Embora, mais de 137 espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos já tenham sido isolados de infecções da glândula mamária bovina (WATTS, 1988), a maioria das infecções são causadas por bactérias. A mastite é a enfermidade mais frequente em bovinos destinados à produção leiteira, a qual causa prejuízos econômicos tanto em fazendas como nos laticínios (LANGONI et al., 1991; COSTA, 1998).

Os microorganismos causadores da mastite podem ser divididos em agentes ambientais e contagiosos (BLOWEY e EDMONDSON, 2010). Os agentes ambientais encontram-se principalmente no ambiente em que o animal vive, e de forma oportunista, invadem a glândula mamária causando imediata resposta inflamatória, o que pode aumentar o potencial de ocorrência de casos de mastite clínica. A mastite clínica se caracteriza pela presença de sinais clínicos evidentes e palpáveis no animal, como dor no quarto afetado, vermelhidão, inchaço, e o mais característico dos sintomas, a presença de grumos no leite. Dependendo da gravidade do caso, secreções sanguinolentas podem ocorrer (PHILPOT e NICKERSON, 2002).Os microrganismos de origem ambiental podem ser classificados em 3 grupos: coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* ssp., *Enterobacter* spp.); estreptococos ambientais, sendo os mais relevantes *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*; e espécies de enterococos (*Enterococcus faecallis* e *Enterococcus* faecium; PHILPOT e NICKERSON, 2002). Coliformes são associados, principalmente, com casos de mastite clínica, podendo causar quadros agudos devido à ação de toxinas liberadas por bactérias (e.g., *E. coli*) após a fagocitose, o que pode levar a vaca à morte em pouco tempo.

Dentre os *Streptococcus* considerados ambientais, as espécies mais prevalentes em IIM são *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. Apesar de serem classificados como ambientais, estas espécies podem ter origem contagiosa. Além disso, podem causar tanto mastite subclínica quanto mastite clínica. Esse grupo representa hoje um dos maiores problemas no controle de mastite,

principalmente devido à alta prevalência de *Streptococcus uberis* (SANTOS e FONSECA, 2007).

O grupo dos enterococos pode ser encontrado na microbiota intestinal de vários mamíferos, pássaros e répteis, além de ser um importante agente causador de mastite bovina ambiental. *Enterococccus* spp. são considerados invasores oportunistas da glândula mamária que multiplicam-se em material de cama orgânica, a qual fornece nutrientes necessários para a sobrevivência destes micro-organismos (BRADLEY, 2002).

O manejo inadequado do ambiente e instalações, seja em confinamento ou pastagens, é o principal responsável pela ocorrência de novas infecções causadas por microrganismos ambientais. Pelo fato desses microrganismos estarem disseminados no ambiente da vaca a irradicação é praticamente impossível, portanto a adoção de medidas de controle do ambiente e a garantia de bem-estar das vacas é fundamental para a redução dos casos de mastite por patógenos ambientais (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Em relação ao perfil de transmissão contagioso de mastite, rebanhos com alta prevalência são caracterizados pela baixa ocorrência de casos clínicos e alta ocorrência da forma subclínica da doença (quadro inflamatório não evidente).. Patógenos comumente causadores de mastite subclínica apresentam maior potencial em ter perfil contagioso, portanto, são transmitidos entre vacas ou entre quartos durante a ordenha (SANTOS e FONSECA, 2006).

A mastite subclínica caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos e é detectada por meio de análises indiretas, como a (CCS), a qual estima o número de leucócitos presentes no leite, e que migram em maior número à glândula mamária em resposta a um processo infeccioso. A forma subclínica de mastite é a mais prevalente em rebanhos leiteiros por não ser diagnosticável em nível de ordenha sem métodos específicos, e por ser, em sua maioria, de caráter contagioso. A mastite subclínica está entre as principais doenças em fazendas leiteiras e causa grandes prejuízos aos produtores, principalmente por estar associada à redução na produção de leite (RUEGG, 2003; ZAFALON et al., 2007). Essa redução ocorre devido a alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade vascular no alvéolo secretor durante a infecção.

Essencialmente, os patógenos contagiosos da mastite podem ser considerados micro-organismos adaptados ao hospedeiro, pois podem sobreviver e multiplicarem-se na glândula mamária.. A transmissão dos patógenos contagiosos normalmente ocorre de vaca para vaca, ou de um teto lesionado para uma vaca sadia por meio das mãos dos ordenhadores, ou por equipamentos de ordenha ou toalhas de uso comum (BRADLEY, 2002). Uma vez acometido, o quarto mamário com mastite pode evoluir para cura espontânea ou, na maioria das vezes, para

um quadro crônico, tornando-se necessária a identificação do agente causador para adequar as medidas de controle e tratamento (OLIVER et al., 2004).

Os principais patógenos causadores de mastite contagiosa são: *Staphylococcus aureus e Streptococcus agalactiae*, os quais são classificados como patógenos primários; e *Corynebacterium spp.* e determinadas espécies *Staphylococcus* coagulase negativa, os quais são classificados como patógenos secundários (WATTS, 1988). *Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo que pode ser encontrado na pele do teto (principalmente se estiver lesionada), no canal do teto ou no interior da glândula mamária. Uma vez presente na glândula mamária coloniza o epitélio secretor, podendo se tornar crônico. *Staphylococcus aureus* é um patógeno que geralmente causa mastite subclínica com aumento e oscilação na CCS (SANTOS e FONSECA, 2007).

Streptococcus agalactiae também é uma bactéria Gram-positiva, a qual está presente principalmente no interior da glândula mamária e em superfícies contaminadas com leite (e.g., teteiras e mãos dos ordenadores). É altamente contagiosa, causa grande aumento da CCS, podendo causar episódios intermitentes de mastite clínica. *Streptococcus agalactiae* é um patógeno que pode ser erradicado do rebanho pois, é considerado um micro-organismo obrigatório do úbere (isolado apenas neste órgão), além de apresentar boa resposta à terapia antimicrobiana (SANTOS et al., 2007)

Dentre os patógenos secundários, *Staphylococcus* coagulase negativa é um grupo de bactérias isolado principalmente em casos de mastite subclínica (KLOOS; BANNERMAN, 1994; TAN et. al, 2006). Apesar de a grande maioria das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa serem de origem ambiental, a espécie *Staphylococcus chromogenes* é considerada a mais adaptada à glândula mamária e a mais frequentemente isolada em casos de IIM (TOMAZI et al., 2015).

Ainda dentro dos patógenos secundários com potencial de perfil contagioso é possível destacar o *Corynebacterium bovis*, o qual é uma das espécies pertencentes ao gênero Corynebacterium, composto por bactérias anaeróbias e Gram-positivas. Essa bactéria é frequentemente isolada em amostras de leite de vacas com mastite subclínica, causando aumento de leve a moderado na CCS (GONÇALVES et al., 2016)

2. 2. Impacto econômico da mastite

A mastite é descrita como um dos fatores mais relevantes na rentabilidade de rebanhos leiteiros, pois afeta diretamente a produção e a qualidade do produto. A mastite resulta em perdas econômicas significativas que estão associadas com redução na produção de leite (mais de 70%), custo com tratamento e serviços médico veterinários (7%), descarte de leite durante o período de tratamento (9%), aumento da mão-de-obra (1%) e descarte prematuro de animais (14%) (MILLER et al., 1993).

Segundo Bartlett et al.,, (1991), a perdas em produção de leite na mastite clínica podem ser divididas em fases distintas: a primeira, chamada fase aguda, é caracterizada pela rápida queda de produção e acontece logo após o aparecimento dos sintomas, seguido de rápida recuperação e dura em torno de seis dias. Durante esse período a queda na produção é de aproximadamente 30%. Após a fase aguda, tem início a segunda fase com duração aproximada de 60 dias, na qual a produção permanece abaixo do normal, podendo persistir até o final da lactação (HORTET e SEEGERS, 1998).

Um estudo sobre perdas na produção decorrente da mastite subclínica nos EUA apontou o impacto econômico anual de 1 bilhão de dólares (OTTS, 1999). As perdas econômicas associadas ao aumento da CCS foi de 810 milhões de dólares (LOSSEINGER et al., 2005). Já em rebanhos ingleses, um estudo avaliou o impacto econômico de doenças que acometem vacas leiteiras e a mastite foi a mais significativa, com 38% do total (KOSSAIBATI et al.,1997). Outro estudo realizado na Inglaterra relatou que 49% das perdas econômicas devido a mastite foram consequência da redução na produção de leite (HILLERTON, et al., 1992).

Casos de mastite ocorridos em uma lactação podem, inclusive, causar prejuízos na lactação subsequente na ordem de 20-30% em comparação com a atual lactação (FETROW et al., 2000). Adicionalmente, os prejuízos com a produção de leite podem estar associados ao agente causador. Considerando o impacto de cada agente na CCS, Wilson et al., (1997) estimou as perdas econômicas associadas a cada patógeno: *Staphylococcus s*pp. US$ 114, *Streptococcus agalactiae* US$ 179, *Staphylococcus aureus* US$ 161, *Streptococcus spp.* US$ 169, *Corynebacterium bovis* US$ 125.

No Brasil, pode-se estimar que em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possa ocorrer perda na produção de 15%, o que significaria um total de 3,3 bilhões de litros ao ano em relação a produção anual de 22 bilhões de litros. Esses prejuízos atingem diretamente o produtor, mas a indústria de laticínios também é afetada pela redução no rendimento na

fabricação de queijos, assim como na diminuição da qualidade e da vida de prateleiras dos produtos lácteos (SANTOS e FONSECA, 2007).

A análise de custos de mastite deveria incluir todas a perdas associadas à ocorrência da doença, assim como os custos das medidas aplicadas no seu controle. No entanto, devido ao caráter multifatorial da mastite, algumas medidas de controle podem ser identificadas exclusivamente para o objetivo de controlar essa infecção, como por exemplo: manutenção de ambiente limpo e seco, estratégias para o aumento no consumo de alimentos, melhoria no conforto dos animais e eficiência no tempo de ordenha, o que dificulta a quantificação desses custos com relação a mastite (FETROW et al., 2000).

2.3. Biofilmes bacterianos

As bactérias são conhecidas pela sua capacidade em adaptar-se e tolerar condições ambientais adversas. Um dos principais mecanismos que facilitam essa adaptação é a capacidade de formar e manter biofilmes. A superfície de adesão pode ser biótica como células e tecidos ou abiótica (origem não-orgânica), como por exemplo, o aço inox. Essa superfície é condicionada a nutrientes necessários, tais como lipídeos e proteínas para que os microrganismos se fixem. Esse processo chama-se adesão irreversível. Classicamente os biofilmes microbianos são definidos como comunidades complexas formadas por microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semi-sólidas envoltas por uma matriz de expolissacarídeos (EPS) (COSTERTON et al., 1995).

A formação de biofilme é considerada um processo altamente complexo que envolve a passagem de uma existência planctônica para um modo séssil de crescimento. Biofilmes são formados por aderência das bactérias à superfície, seguindo-se a acumulação, maturação e liberação, que são essenciais para a disseminação e persistência da bactéria (FEY e OLSON, 2010). Este modo séssil de crescimento permite que a comunidade bacteriana presente no biofilme seja protegida contra as condições adversas, tais como, dessecação e ação de antimicrobianos (CLUTTERBUCK et al., 2007). A Microscopia de varrimento à laser confocal com medições por microelétrodos permitiram estabelecer que o biofilme é composto por aglomerados de célulaspresentes em uma matriz de EPS. Estes conjuntos podem apresentar formas diferentes variando de formatos cilíndricos ("pilares") a filamentos em "forma de cogumelo", o que permite a disponibilidade máxima de nutrientes e baixa exposição (CONSTERTON et al., 1995).

As etapas de formação de biofilmes bacterianos podem ser divididas em 5 fases ou estágios (FIGURA 1). Na primeira fase as bactérias planquitônicas ou livres dispersas no meio se aproximam da superfície sólidas através de fluidos ou motilidade. Esse processo ainda é considerado reversível pois depende de forças de interação de Van der Walls que influenciam o processo de adesão, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (STEWART et al., 2002).

Na segunda fase ocorre a transição da fase reversível para fase irreversível que acontece através da secreção de polímeros extracelulares ou produção de adesinas específicas (flagelos, fímbrias). Com isso os microrganismos conseguem se imobilizar e iniciar sua multiplicação e formar uma monocamada (STEWART et al., 2002).

Na terceira fase acontece o desenvolvimento inicial da estrutura e formação do biofilme; e posteriormente, na quarta fase ocorre a formação de micro-colônias no biofilme maduro onde substâncias poliméricas possibilitam o acesso aos nutrientes. Nesta fase, forma-se uma estrutura de bactérias rodeadas por canais de água que possibilitam a entrada de nutrientes e oxigênio e permitindo a excreção de metabólitos. As bactérias que estão dentro da estrutura do biofilme se diferenciam metabolicamente, fisiologicamente e desenvolvem padrões de crescimento diferentes das bactérias planquitônicas. E finalmente na quinta fase ocorre a dispersão das bactérias para o ambiente e o ciclo se reinicia (STEWART et al., 2002)

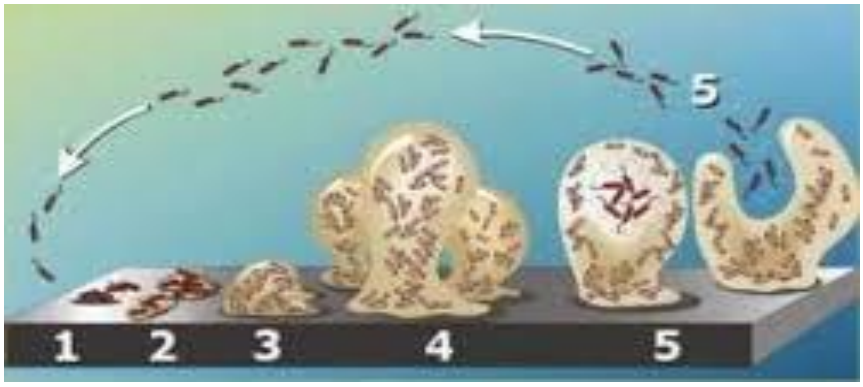

Figura 1: Etapas da formação de biofilmes.
Fonte: Stoodley, et al., (2002)

A formação do biofilme cria uma barreira de proteção contra os antimicrobianos. As falhas nos tratamentos antimicrobianos podem ser causadas por um ou por vários mecanismos de resistência do biofilme. Um desses mecanismos é a incapacidade do agente antimicrobiano de penetrar no biofilme, o qual neste caso, funciona como uma barreira física. Além disso, as substâncias poliméricas são conhecidas por retardar a difusão dos antibióticos. Os antibióticos podem penetrar no biofilme facilmente em alguns casos e mal em outros, dependendo do agente

que está formando o biofilme, pois, o tipo de estrutura do biofilme determina o transporte de nutrientes e consequentemente de antimicrobianos.

Os mecanismos mais conhecidos de resistência à antimicrobianos não são necessariamente os responsáveis pela proteção de bactérias em um biofilme (STEWART e COSTERTON, 2001) e os mecanismos convencionais não são suficientes para explicar a maioria dos casos de infecções relacionadas com biofilmes. Mesmo bactérias sensíveis que não têm uma base genética de resistência conhecida podem ter a sua susceptibilidade reduzida quando formam um biofilme. Quando as bactérias são liberadas do biofilme elas geralmente se tornam rapidamente suscetíveis a antibióticos (STEWART, 2002), o que sugere que a resistência de bactérias em biofilmes não é adquirida através de mutações ou elementos genéticos móveis.

Existem quatro hipóteses principais em relação à redução da ação de antimicrobianos na presença de biofilme, as quais estão apresentadas na **Figura 2**. A primeira é a possibilidade de penetração lenta ou incompleta do antibiótico no biofilme. Segundo Kobayashi et al. (2007), alguns antibióticos podem penetrar facilmente nos biofilmes *in vitro*, pois não existe nenhuma barreira genética para difusão de solutos ou moléculas do mesmo tamanho dos antibióticos através da matriz do biofilme, que é composta principalmente de água.No entanto, se o antibiótico é desativado no biofilme *in vivo* a penetração é retardada.

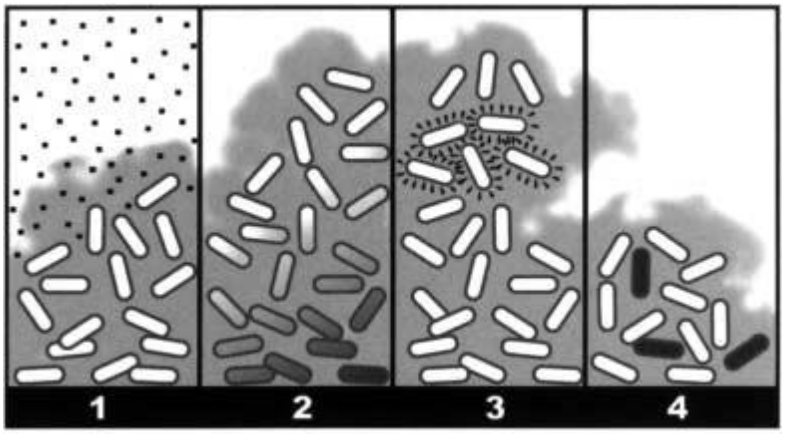

Figura 2: Mecanismos de resistência à antimicrobianos em biofilmes (STEWART, 2002)

A segunda hipótese consiste na alteração do microambiente no biofilme. Dentro da estrutura existem gradientes de concentração de nutrientes e os estudos relatam que o oxigênio pode ser completamente consumido nas camadas mais superiores do biofilme gerando um ambiente anaeróbico no interior do biofilme. Pode ocorrer diferenças de pH ao longo do biofilme devido ao acumulo de ácidos em locais do biofilme, gradientes de concentração

diferentes, produtos metabólicos e substratos, o que pode afetar diretamente a ação dos antibióticos (WERNER et al., 2004). A penicilina por exemplo tem como alvo a síntese da parede celular, portanto sua atuação é na multiplicação da parede celular (YANG et al., 2008). Desta forma, a atuação da penicilina será ineficiente contra bactérias sob biofilme, visto que neste caso existem áreas metabolicamente inativas (DRIFFELD et al., 2008). Além disso o ambiente dentro do biofilme pode ter a pressão osmótica alterada, o que leva à indução de uma reposta ao estresse osmótico, contribuindo para a resistência aos antibióticos. Este processo altera a relação entre a proporção de porinas, o que reduz o a permeabilidade do envelope celular aos antibióticos (MOLIN et al., 2003).

A terceira hipótese leva em consideração a capacidade que o biofilme tem de reduzir a resposta ao tratamento com antimicrobianos. O biofilme possibilita o retardo na penetração de antibióticos e isso ajuda e possibilita que a bactéria ative respostas fisiológicas como por exemplo bombas de efluxo. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* em biofilme são capazes de ativar o Katb, um gene indutor da catalase, em resposta ao tratamento com 50 mM peróxido de hidrogénio (ELKINS et al., 1999).

A quarta hipótese é que o mecanismo de resistência do biofilme acontece por uma subpopulação de microrganismos altamente protegidos com diferenciações fenotípicas semelhante a formação de esporos. A maioria das bactérias no biofilmesão rapidamente mortas pela ação dos antibióticos,) porém, as sobreviventes (podendo ser menos de 1% da população inicial) persistem apesar da exposição contínua ao antibiótico (OLIVER et al., 2000; CIOFU et al., 2005). A hipótese de algumas bactérias ficarem em estado de possíveis “esporos” dentro do biofilme sugere uma explicação para reduzida susceptibilidade aos antibióticos e desinfetantes de diferentes composições químicas.

Na mastite a formação de biofilme ocorre causando infecções crônicas que não respondem a tratamentos convencionais. Alguns patógenos causadores de mastite podem produzir biofilmes no interior da glândula mamária de bovinos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa *e Streptococcus uberis*. (BORDIAU et al., 2016; ZUNIGA et al., 2015; MELCHIOR et al., 2006; VERHIMO et al., 2010; TREMBLAY et al., 2013; CLUTTERBUCK et al., 2007).

2.4. Terapia antimicrobiana e resistência bacteriana

A terapia antimicrobiana é um componente importante no controle da mastite nos rebanhos leiteiros (HILLERTON et al., 2005;OLIVER et al., 2011). Entretanto, o uso prudente e racional de antimicrobianos deve ser respeitado, visto que a utilização destas substâncias

indiscriminadamente pode criar uma pressão seletiva de espécies resistentes e alterar a ecologia bacteriana (GUARDABASSI et al., 2010).

Em se tratando de doenças infectocontagiosas como a mastite, é preciso considerar alguns aspectos no desenvolvimento de estratégias de controle em fazendas leiteiras, o que inclui: identificação de patógenos causadores de doenças específicas; e a determinação das classes de medicamentos mais apropriados para utilizar nos tratamentos. Protocolos terapêuticos devem considerar fatores importantes, como a dosagem do produto a ser aplicado, a via de administração, a duração do tratamento e o monitoramento de mudanças nos perfis de susceptibilidade do patógeno. A utilização de antimicrobianos no tratamento da mastite deve visar benefícios econômicos e eficácia terapêutica, como o retorno da produção de leite da vaca e redução de quartos afetados que podem ser fontes de infecção, além de melhorar o bem estar do animal (SPINOSA et al., 2011). Além disso, o leite de vacas tratadas para mastite está associado com uma maior incidência de resíduos de antibióticos no leite, o que que pode causar mais prejuízos para os laticínios e também riscos para saúde humana.

A glândula mamária bovina é um órgão difícil para ação dos antimicrobianos. A absorção e distribuição no úbere de antimicrobianos aplicados pela via intramamárias e parenteral depende de características farmacocinéticas como: tipo de veículo e a solubilidade lipídica do produto, grau de ligação das proteínas séricas, grau de ionização, e de características do úbere (CONSTABLE et al., 2003). A farmacodinâmica é outro ponto que deve ser considerado, pois o leite não deve interferir na atividade antimicrobiana. A atividade de trimetopim/sulfonamidas, tetraciclinas e macrolídeos demostrou ser reduzida no leite (FANG et al., 1996),.

As propriedades físico-químicas dos medicamentos são levadas em consideração na farmacocinética por influenciarem diretamente na concentração do composto que atinge a glândula mamária. Os antibióticos intramamários difundem-se rapidamente e atingem toda glândula e podem ser absorvidas do úbere para a corrente sanguínea e vice-versa, dependendo do grau de ligação às proteínas e pKa do medicamento (ADAMS et al., 2003).

O uso de agentes antimicrobianos nos animais de produção tem as seguintes funções: terapia, profilaxia e promoção de crescimento. A profilaxia é utilizada para prevenir e controlar uma possível infecção em um período da vida do animal que ele está mais susceptível a uma ou algumas doenças (GUARDABASSI et al., 2010).

A profilaxia em vacas leiteiras é utilizada durante o período não produtivo da vaca para curar uma possível infecção existente e prevenir que ocorra uma nova infecção, por exemplo, no caso da terapia de vaca seca (TVS). A TVS é um método de prevenção e controle de mastites

em vacas leiteiras e tem como objetivos eliminar infecções existentes durante a lactação, e prevenir novas infecções durante o período seco, período em que as vacas permanecem susceptíveis a uma nova infecção (ROBERT et al., 2006).

Além da antibióticoterapia preventiva na terapia de vaca seca existem também produtos à base de substâncias inertes conhecidos como selantes de tetos, os quais são aplicados na com o objetivo de prevenir IIM durante o período seco. Uma meta análise realizada por Rabiee e Lean, (2013) relatou que o uso de selantes de tetos é uma alternativa para reduzir o uso de antimicrobianos. Além disso, o estudo reportou que o uso de selantes reduz o risco de IIM pós-parto (25%), bem como, o risco de MC (29%); o uso de selante comparado com a não utilização do produto reduziu o risco de IIM em 73%. Outra estratégia que visa reduzir o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros é a terapia seletiva de vaca seca, onde só os animais com infecções intramamárias recebem o tratamento antibiótico (WHIST, 2006).

Os antimicrobianos apresentam duas funções distintas: 1) ação bacteriostática, na qual ocorre inibição do crescimento bacteriano e manutenção das bactérias na fase estacionária; e, 2) ação bactericida, na qual ocorre a destruição bacteriana por meio da atuação do antimicrobiano em processos vitais do micro-organismo, os quais causam a morte celular (LAGO, 2011).

Os antimicrobianos são classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, tais como, distribuição do princípio ativo nos tecidos, forma de excreção e biodisponibilidade. Existem várias classes de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária e os mais utilizados pertencem às seguintes classes: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, lincosamidas, tetraciclinas.

Os beta-lactâmicos são as penicilinas e cefalosporinas que atuam impedindo a síntese da parede celular, portanto são bactericidas e atuam melhor quando os microrganismos estão em fase de multiplicação. O mecanismo de ação é a habilidade de interferir na síntese do peptideoglicano (responsável pela integridade da parede bacteriana). Como representante desse grupo temos as penicilinas naturais (e.g., penicilina G), penicilina resistentes à penicilinase (e.g., oxacilina) e penicilinas de 2° geração (e.g., ampicilinas e amoxicilina). As cefalosporinas são dividas em compostos de 1° geração (e.g., cefalotina) e 3° geração (e.g., ceftiofur) (SPINOSA et al., 2011).

Outra classe é a dos aminoglicosídeos que atuam interferindo na síntese proteica bacteriana, promovendo a síntese de proteínas defeituosas, e assim, causando a morte celular, portanto, são antibióticos bactericidas (ex: gentamicina, neomicina). Os macrolídeos são considerados antimicrobianos de espectro de ação intermediário. Sua ação ocorre através da inibição da

síntese proteica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossoma, particularmente na molécula 23S do RNA. Os aminoglicosídeos atuam impedindo as reações de transpeptidação e translocação (e.g., eritromicina; ADAMS, 2003).

As quinolonas inibem a atividade da enzima DNA girase ou topoisomerase II, a qual é essencial para a sobrevivência bacteriana. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, o que causa a morte das bactérias. As quinolonas de 2° geração (fluoroquinolonas), são as mais utilizadas em medicina veterinária, das quais destaca-se a enrofloxacina (SPINOSA et., al, 2011).

As lincosamidas atuam inibindo a síntese proteica nos ribossomos e ligando-se a subunidade 50S, portanto, são compostos bacteriostáticos. Antimicrobianos desta classe alteram a superfície bacteriana, o que facilita a opsonização, a fagocitose e a destruição intracelular dos microrganismos. Um composto da classe das lincosamidas comumente utilizado é a pirlimicina (WANG et al., 2008).

As tetraciclinas e análogos são bacteriostáticos e apresentam amplo espectro de ação, o que lhes confere ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquétsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários. Tais compostos penetram na célula por difusão, em um processo dependente de gasto de energia. Após, ligam-se de maneira reversível à porção 30S do ribossoma e bloqueiam a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica (SPINOSA, et al., 2011).

A administração de antimicrobianos pode ser um potencial fator de risco para seleção de bactérias resistentes devido a fatores como a pré-existência de genes de resistência e a pressão seletiva. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida por conjugação, transformação ou transdução. A resistência intrínseca ou natural ocorre de um fator estrutural ou funcional, associado com espécies bacterianas, um gênero ou um grande grupo. Ou seja, faz parte das características biológicas primitivas dos micro-organismos. Isso ocorre devido à expressão de genes que codificam estruturas ou mecanismos que impedem a ação do antimicrobiano sobre o alvo (GUARDABASSI et al., 2010).

Por outro lado, a resistência adquirida ocorre a partir de alterações genéticas, as quais podem ser uma consequência de mutações ao acaso em genes próprios ou aquisição horizontal de genes exógenos. As bactérias podem adquirir genes de resistência pela captura de DNA (transformação); via bacteriófagos (transdução); ou pela transferência de célula para célula (conjugação). A conjugação é o mais importante meio de transferência de genes de resistência a antimicrobianos devido ao vasto espectro de hospedeiros e a localização frequente de genes

de resistência em elementos conjugativos como plasmídeos e transposons. Em alguns casos a resistência pode resultar da combinação de eventos de mutação e transferência de genes (GUARDABASSI et al., 2010).

Preocupações sobre os níveis de uso de antimicrobianos na produção de alimentos e da potencial associação com o desenvolvimento e surgimento de resistência aos antimicrobianos, já causa impactos em políticas de uso de drogas em vários países. Questões relacionadas ao uso de antimicrobianos em sistemas de produção leiteira a serem consideradas são: uso de antimicrobianos sem supervisão de um Médico Veterinário; a utilização de agentes antimicrobianos sem indicação para mastite; o relacionamento entre as práticas de uso de antibióticos e o risco para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana; o desenvolvimento e validação de métodos para quantificar e documentar práticas de uso de antimicrobianos; e o efeito do uso prudente (BARLOW, 2011).

Uma questão importante também a se considerar é que uma serie de bactérias patogênicas para humanos têm reservatórios em animais e podem ser transmitidas para humanos por alimentos contaminados (transmissão de origem alimentar), exposição a animais (transmissão direta) ou ambientes contaminados (transmissão ambiental). Além disso, as bactérias dos animais que não são patógenos para humanos podem servir como doadoras de genes de resistência a outros micro-organismos de interesse da medicina humana (GUARDABASSI et al., 2010).

Preocupações sobre os níveis de uso de antimicrobianos na produção de alimentos e da potencial associação com o desenvolvimento e surgimento de resistência aos antimicrobianos, já causa impactos em políticas de uso de drogas em vários países. Questões relacionadas ao uso de antimicrobianos em sistemas de produção leiteira a serem consideradas são: uso de antimicrobianos sem supervisão de um Médico Veterinário; a utilização de agentes antimicrobianos sem indicação para mastite; o relacionamento entre as práticas de uso de antibióticos e o risco para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana; o desenvolvimento e validação de métodos para quantificar e documentar práticas de uso de antimicrobianos; e o efeito do uso prudente (BARLOW, 2011).

Uma questão importante também a se considerar é que uma serie de bactérias patogênicas para humanos têm reservatórios em animais e podem ser transmitidas para humanos por alimentos contaminados (transmissão de origem alimentar), exposição a animais (transmissão direta) ou ambientes contaminados (transmissão ambiental). Além disso, as bactérias dos animais que não são patógenos para humanos podem servir como doadoras de

genes de resistência a outros micro-organismos de interesse da medicina humana (GUARDABASSI et al., 2010).

Preocupações sobre os níveis de uso de antimicrobianos na produção de alimentos e da potencial associação com o desenvolvimento e surgimento de resistência aos antimicrobianos, já causa impactos em políticas de uso de drogas em vários países. Questões relacionadas ao uso de antimicrobianos em sistemas de produção leiteira a serem consideradas são: uso de antimicrobianos sem supervisão de um Médico Veterinário; a utilização de agentes antimicrobianos sem indicação para mastite; o relacionamento entre as práticas de uso de antibióticos e o risco para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana; o desenvolvimento e validação de métodos para quantificar e documentar práticas de uso de antimicrobianos; e o efeito do uso prudente (BARLOW, 2011).

Uma questão importante também a se considerar é que uma serie de bactérias patogênicas para humanos têm reservatórios em animais e podem ser transmitidas para humanos por alimentos contaminados (transmissão de origem alimentar), exposição a animais (transmissão direta) ou ambientes contaminados (transmissão ambiental). Além disso, as bactérias dos animais que não são patógenos para humanos podem servir como doadoras de genes de resistência a outros micro-organismos de interesse da medicina humana (GUARDABASSI et al., 2010).

Para se avaliar *in-vitro* se as bactérias são sensíveis ou resistentes ao antimicrobianos existem comitês como Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases (EUCAST) que estabeleceram metodologias padronizadas para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos, como os tamanhos de halos no caso da disco difusão em ágar e pontos de interrupção no caso da concentração inibitória mínima (CIM; CLSI, 2008; EUCAST, 2015).

O teste de disco difusão em ágar Mueller Hinton fornece informações sobre susceptibilidade microbiana *in vitro*. O teste fornece resultados qualitativos e é um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano **(Figura 3)**. O teste é realizado dispensando-se os discos de papel-filtro impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas sobre a placa de ágar após a semeadura do inóculo bacteriano (aproximadamente 1 a 2 x 10^8 UFC/mL; ANVISA, 2008).

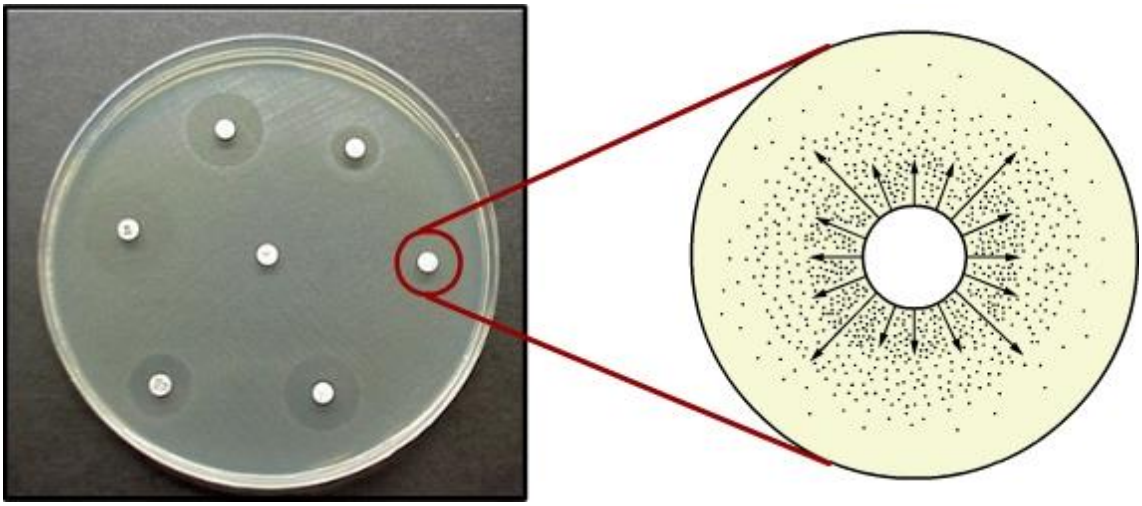

Figura 3: Teste de disco difusão em ágar (ANVISA, 2008).

2.5. Características etiológicas e epidemiológicas relacionadas ao *Staphylococcus aureus* como agente causador de IIM

Staphylococcus aureus é um coco Gram-positivo, catalase positivo, anaeróbio facultativo, com motilidade negativa e não-formador de esporos. Esse patógeno pode causar episódios recorrentes e crônicos de mastite de clínica e subclínica, que coloniza principalmente a pele, epitélios e membranas mucosas dos animais e humanos (NMC, 2004).

S. aureus coloniza rapidamente a pele e o canal do teto, podendo ser isolado, inclusive, em glândulas mamárias de novilhas antes do parto (PHILPOT e NICKERSON, 2002). É reconhecido como o principal patógeno da mastite bovina e seus principais sítios de localização são os quartos infectados (SALASIA et al., 2004). Além da glândula mamária, o *S. aureus* foi isolado também da pele e orifício do teto, jarrete, instalações, alimentos, insetos, mãos dos funcionários e equipamentos de ordenha (OLIVER et al., 2004). A infecção ocorre via canal do teto e o *S. aureus* possui grande capacidade de se instalar em áreas profundas da glândula mamária

Staphylococcus. aureus possui vários fatores de virulência que facilitam a sua adaptação à glândula mamária, como: produção de fatores anti-fagocíticos (proteína A e cápsula) (BASELGA et al., 1994;COSTERTON et al., 1981; SUTRA e POUTREL, 1994); capacidade de adesão às células epiteliais da glândula mamária (ALMEIDA et al., 1997;ALMEIDA et al., 1996; CIFRIAN et al., 1994); sobrevivência no interior dos macrófagos e células epiteliais da glândula mamária (HENSEN et al., 2000; LAMMERS et al., 1999); e produção de toxinas, superantígenos bacterianos e proteases (BRAMLEY et al., 1989; LARSEN et al., 2000). Uma

vez instalado o *S. aureus* pode causar ulceração e erosão nos tecidos e canais, o que facilita a oclusão dos ductos e alvéolos e o seu isolamento na glândula mamária. Este processo etiológico prejudica a ação de mecanismos de defesa, bem como, a ação de antimicrobianos (SUTRA e POUTREL, 1994).

Quanto à eficácia da terapia com o uso de antimicrobianos, os estudos mostram que o risco de cura é de 20-70% dos casos de mastites por *S. aureus* tratados com antibióticos durante o período seco e de apenas 10-30% de risco de cura durante a lactação (PHILPOT e NICKERSON, 1991). Utilizando terapia estendida (8 dias) com ceftiofur aplicado pela via intramamária a taxa de cura foi de 36% (OLIVER et al., 2004). A ineficiência do tratamento pode ser resultado do desenvolvimento de resistência ao antimicrobiano utilizado e também pela capacidade do *S. aureus* de ficar aderido intracelularmente no epitélio da glândula mamária além de outros fatores como a capacidade de formação de biofilme. Normalmente a ação dos antibióticos fica prejudicada pelos vários mecanismos de defesa, mas segundo estudos a capacidade de formar biofilmes é uma das principais causas de falhas no tratamento com antimicrobianos tanto em cepas de origem humana quanto de origem animal (MELCHIOR et al., 2011; DUFOUR et al., 2012; XUE et al., 2014; STEPANOVIC et al., 2000; MELCHIOR et al., 2009; PEREYRA et al., 2016). Existem evidencias de que *S. aureus* possui genes que codificam a formação de biofilmes, sendo uma habilidade inata (BASELGA et al., 1993) que causainfecções intramamárias persistentes (CUCARELLA et al., 2004).

A formação de biofilme é mediada pela produção de polissacarídeo intercelular com adesinas chamado PIA ou poly-N-succinil-β-1,6-glucosamina. Essa síntese é codificada pelo gene do locus *ica* do operon *ica* ABCD. Tais genes são fundamentais para a formação de biofilmes e para a virulência dos microrganismos, e são regulados por fatores ambientais como por exemplo a glicose, anaerobiose e a temperatura (O'TOOLE et al., 2000).

Durante muito tempo, uma questão muito debatida foi se locus *ica* é necessário para a produção de biofilmes, mas em algumas cepas de *S. aureus* que transportam o operon *ica*, a exclusão da O operon não prejudica a sua capacidade de formar biofilme (O'GARA et al., 2007). A matriz extracelular do biofilme também abriga proteínas adesivas que fazem parte da formação do biofilme. O primeiro membro deste grupo de proteínas foi identificado em um isolado de *S. aureus* e foi chamada de BAP (proteína associada ao biofilme (CUCARELLA et al., 2001).

As seguintes características estruturais são comumente observadas nas BAP: (1) estão presentes na superfície bacteriana; (2) apresentam um peso molecular elevado; (3) contém repetições em tandem em um domínio do núcleo; (4) conferem às bactérias a capacidade para

formar biofilme; (5) desempenham um relevante papel em processos infecciosos bacterianos; e (6) podem ocasionalmente estar contidas em elementos móveis (LASA e PENADES, 2005).

Outras proteínas relacionadas com a formação de biofilme são SasG, as quais têm ação durante a fase de acumulação (GEOGHE et al., 2010), SasC durante a fase de colonização (SCHOROEDER et al., 2009), proteína A durante a fase de agregação e formação (MERINO., 2009).

Outro fator de virulência associado com *S. aureus* são as adesinas. A classe de adesinas de superfície celular que interagem especificamente com os componentes de matriz extracelular são designadas MSCRAMMS (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules).* Fazem parte desse "complexo" as fibromectinas FnbpA (TETZ, et al., 2010) e FnbpB (CRISTNER, et al., 2010) e o fibrinogênio CLF (clumping factor).

2.6 Características etiológicas e epidemiológicas relacionadas ao *Streptococcus uberis* como agente causador de IIM

Os estreptococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, não formam esporos, tem forma esférica (coco) e suas dimensões variam entre 0,2 a 1,2 µm. Formam longas cadeias, mas podem formar pequenas cadeias de quatro células ou de cocos agrupados em duas células. Esfregaços em meios sólidos formam cadeias curtas ou aos pares. É aeróbio e anaeróbio facultativo, catalase e oxidase negativa, possui necessidades nutricionais complexas e variáveis que refletem a sua adaptação como um comensal ou agente patogênico (NMC, 2004). Durante o isolamento, produz hemólise do tipo alfa, hidrolisa a esculina e o hipurato de sódio e não cresce no meio bile esculina (NMC, 2004) e produz ácido a partir de inulina (WATTS, 1988).

Streptococcus uberis é um dos patógenos ambientais mais prevalentes associados à ocorrência de IIM clínica e subclínica (JAYARAO et al., 1999). Com a implantação de programas de controle de mastite e estratégias de redução de casos de mastite por patógenos contagiosos, *S. uberis* se apresenta como um problema crescente (PITKALA et al., 2008). Estudos conduzidos em diversos países relatam alta prevalência desse agente, tais como, Reino Unido (HILLERTON et al., 1993), EUA (HOGAN et al., 1989a) e os Países Baixos (BARKEMA et al., 1998). Em um estudo realizado nos EUA, *S. uberis* apresentou alta frequência em vacas multíparas durante o período seco, o que é um fator de risco para a mastite clínica no peri-parto, tanto em vacas quanto novilhas (LEIGH, 1999; OLIVER et al., 2005). O risco de IIM pode ser elevado, inclusive, no início do período seco, especialmente em rebanhos que não usam TVS (WILLIAMSON et al., 1995). As tentativas de vacinação contra a mastite

causada por esse agente não foram bem sucedidas, portanto o controle de *S. uberis* deve ser baseado em um detalhado conhecimento do perfil de transmissão (LEIGH et a., 1999).

Os fatores ambientais desempenham um papel importante na exposição do úbere ao *S. uberis*, o qual pode ser isolado de diversas regiões do corpo do animal, incluindo a vagina e mucosas (CULLEN, 1966), além do ambiente em que a vaca vive, como a cama, solo, fezes e água (TODHUNTER et al., 1995). Apesar de a principal via de transmissão ser a partir de fontes ambientais, estudos epidemiológicos recentes com uso de técnicas moleculares de genotipagem demonstraram que a transmissão de vaca para vaca pode ocorrer (FUENTES et al., 2001). Vários genótipos de *S. uberis* foram observados por métodos moleculares (JAYARAO et al., 1992, PHUEKTES et al., 2001). O grau de homogeneidade de genótipos de *S. uberis* isolados a partir de um rebanho foi usado para inferir a rota predominante de transmissão. Em situações onde um genótipo predominante é identificado, é sugerido que a transmissão ocorra vaca-de-vaca (contagiosa); por outro lado, se um grande número de genótipos está presente e nenhum tipo predomina, é provável que os patógenos tenham origem ambiental (ZADOKS, 2001).

Quanto ao tipo de mastite (MC ou MSC), existem tipos relacionados com a ocorrência de mastite clínica e outros relacionados com a mastite subclínica Fuertes et al., (2001). Um estudo conduzido por Jayarao et al., (1992) demonstrou que apenas 21% dos fragmentos de DNA de *S. uberis* analisados de casos de mastite clínica também pertenciam a isolados de mastite subclínica. Através de métodos moleculares as diferenças genotípicas podem ser associadas com as diferenças na patogenicidade. Além de exercerem um importante papel como patógenos da mastite, os estreptococos contribuem para as altas contagens de bactérias do leite de tanque de rebanhos.

Para que ocorra a infecção o microrganismo tem que ser capaz de resistir aos mecanismos de defesa da glândula mamária (LEIGTH et al., 1999), portanto, as bactérias precisam de mecanismos para invadir e permanecer na glândula mamária. Esses mecanismos são conhecidos como fatores de virulência. *Streptococcus uberis* possui vários fatores de virulência como os ativadores de plasminogênio, proteína de ligação a lactoferrina, e molécula de adesão e internalização.

Os ativadores de plasminogênio atuam regulando a atuação da plasmina, a qual tem papel fundamental na degradação da fibrina e outras proteínas da matriz extracelular. Além disso, a plasmina atua no processo de remodelação de tecidos e muitas bactérias possuem mecanismos para utilização desses ativadores. Existem moléculas com essa função descritas em nível de gênero como a estreptoquinase (SK). Em nível de espécie dois ativadores de plasminogênio estão associados com o *S. uberis*, o PauA e PauB. O PauA é encontrado em várias populações

de *S. uberis*. Nas populações onde esse gene é ausente, o PauB foi encontrado como um ativador de plasminogênio alternativo (JOHNSEN et al., 1999; LEIGH, 2002).

Outro fator que o *S. uberis* utiliza para burlar o sistema imunológico da vaca é a capacidade de interagir com a lactoferrina. A lactoferrina é um bacteriostático inespecífico da glândula mamária que pode ser encontrado no soro do leite, mas possui altas concentrações em secreções da glândula não lactante e também pode ter atividade na regulação e modulação da atuação dos neutrófilos, linfócitos e macrófagos (FANG e OLIVER, 1999). Com a utilização da lactoferrina o *S. uberis* produz uma proteína que se liga à ela e é utilizada para aderência e internalização na células epiteliais da glândula mamária, a qual foidenominada molécula de adesão de *S. uberis* (SUAM) (ALMEIDA et al., 2006) .

Além dessa capacidade de aderência e internalização, um recente estudo *in vitro* mostrou que a alfa e beta-caseína aumenta a formação de biofilmes e sugeriu que a formação de biofilme em *S. uberis* é mediada por proteínas (VARHIMO et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Qualileite (Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite) do Departamento de Nutrição e Produção Animal, FMVZ -USP, localizado em Pirassununga – SP. As cepas de *S. aureus* e *S. uberis* foram isoladas a partir de um total de 2100 amostras de leite vacas com mastite subclínica, de 17 rebanhos, avaliadas na análise de rotina do Laboratório Qualileite. As amostras de mastite clínica foram obtidas a partir 5957 amostras de leite, de 20 rebanhos leiteiros. Desta forma, para obtenção dos isolados de *S. aureus* e *S. uberis* foram analisadas 8057 amostras de leite, de 37 rebanhos, localizados na região de Pirassununga-SP e na região Sul do estado de Minas Gerais. Foram selecionados para este estudo 262 (176 de MSC e 86 de MC) isolados de *S. aureus* e 258 isolados de *S. uberis* (137 de MSC e 121 de MC). Para os testes de capacidade de formação de biofilme e resistência *in vitro* aos antimicrobianos foram utilizados 197 isolados de *S. aureus* (111 de MSC e 86 de MC) e para o *S. uberis* foram utilizados 119 isolados (104 de MC e 15 de MSC). Foram excluídos do presente estudo 65 isolados de *S. aureus* e 139 de *S. uberis* em razão de ausência de crescimento após congelamento dos isolados.

3.1. Cultura microbiológica

Para o procedimento de isolamento e identificação de patógenos causadores de mastite foi utilizada a metodologia recomendada pelo *National Mastitis Council* (NMC, 2004). O isolamento primário foi realizado em meio ágar sangue. O crescimento das colônias bacterianas foi observado após 24 e 48 horas de incubação. De acordo com as características das colônias, (cor, aspecto, tamanho e presença de hemólise) e observação por microscopia óptica após coloração de Gram, as colônias foram submetidas à prova enzimática da catalase. As colônias isoladas presumivelmente como estafilococos (cocos e catalase positiva) foram submetidas à prova de coagulase e aglutinação em látex. Os isolados foram identificadas como *S. aureus* quando apresentaram as seguintes características: cocos Gram positivos, catalase positivos, positivos nas provas da coagulase, aglutinação em látex. As colônias isoladas presumivelmente como estreptococos (catalase negativa) foram submetidas ao teste de CAMP e esculina, PYR e bile esculina. Os isolados foram identificados como *S. uberis* quando apresentaram as seguintes características: cocos gram positivos, catalase negativa, CAMP positivo ou negativo, esculina positiva, bile esculina negativo. Após identificação, todos os isolados de *S. uberis* (n=258)e *S. aureus(*n=262*)* foram inoculados em 1,5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em triplicata

e após 24 horas de crescimento foi colocado uma solução com 10% de glicerina e os isolados foram congelados sob temperatura de -80°C, até a realização das análises pelas metodologias de biofilme e sensibilidade aos antimicrobianos. Todos os isolados identificados como *S. uberis* pela metodologia de cultura bacteriológica convencional (NMC, 2004) foram submetidas a metodologia de MALDI-TOF-MS, que foi utilizada confirmação de identificação de isolados de *S. uberis*. Somente os isolados de *S. uberis* que tiveram identificação confirmada pela metodologia de MALDI-TOF-MS foram utilizadas para as análises de de formação de biofilme e resistência *in vitro* aos antimicrobianos.

3.2. Identificação bacteriana por MALDI TOF – MS

Após o descongelamento, os isolados identificados como *S. uberis* pela cultura bacteriológica convencional (NMC, 2004), foram submetidos à Identificação bacteriana por MALDI TOF – MS, de acordo com metodologia descrita por Lartigue et al. (2009). Os isolados foram cultivados em caldo BHI e incubados por 24 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm por 2 min para formação do *pellet* bacteriano. O *pellet* de bactérias obtido foi diluído em 300 µL de água Milli-Q, agitado e posteriormente foram acrescentados 900 µL de etanol visando a inativação das bactérias, nova centrifugação para formação de *pellet*, sendo então o sobrenadante retirado com pipeta. Após a secagem do pellet em temperatura ambiente, foi acrescentada solução de ácido fórmico 70% em quantidade suficiente para cobrir o *pellet* (30~50 µL) e lisar as células bacterianas. Após homogeneização do conteúdo, foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila 100% (30-50 µL). Na etapa final do preparo, foi feita a centrifugação para separar os sedimentos de células bacterianas do sobrenadante contendo proteínas bacterianas, principalmente proteínas ribossomais, das quais se obteve os espectros de MALDI-MS utilizado para a identificação bacteriana. A leitura foi realizada no Departamento de Biofísica da Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Os espectros foram obtidos no equipamento Microflex LT MALD - TOF MS (Bruker®) e a leitura dos espectros foi feita através do software Biotyper (Bruker®). O resultado foi baseado no algoritmo (escore) lançado pelo software Biotyper 3.0. Valores de escores maiores que 1.7 foram considerados confiáveis para a provável identificação de gênero, e escores maiores que 2.0 foram considerados confiáveis para identificação do gênero e provável identificação de espécies.

3.3. Formação de biofilme em microplacas de polietileno

Após o descongelamento, todos isolados de *S. aureus* e *S. uberis* foram inoculados em meio ágar sangue (5% sangue bovino) e realizados os testes de identificação para confirmação do agente (NMC, 2004). A capacidade formação de biofilme de isolados de *S. aureus e de S. uberis* foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Stepanović et al. (2003) e Moore (2005). Cada isolado foi ressuspendido em caldo contendo TSB (TSB/Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), incubado à 37°C por 24 horas, e diluído até concentração de 10^8 ufc/mL (escala 0,5 de MacFarland). Alíquotas de 200 µL de cada isolado, em triplicatas, foram transferidas para microplacas de poliestileno estéril com 96 poços de fundo chato, e incubadas em estufa bacteriológica, à 37°C por 24 horas.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas 3 vezes com 300 µL de água destilada estéril e fixadas com 250 µL de metanol por 15 minutos em temperatura ambiente, coradas com 250ug de cristal de violeta por 5 minutos, submetidos a 3 lavagens com 300 µL de água destilada estéril, foram secadas e ressolubilizadas com 250 µL de ácido acético glacial a 33% (vol/vol).

A formação de biofilme nas microplacas foi medida em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 540 nm para *S. aureus* e 620 nm para *S. uberis* e os resultados foram expressos como densidade ótica (OD). Foi utilizado como controle negativo o TSB estéril conforme descrito por Stepanović et al. (2003). Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, como controle negativo (não produtor de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, como controle positivo (forte produtor de biofilme) e usadas como referência para determinar a capacidade dos isolados de *S. aureus e S. uberis* na produção de biofilme.

3.4. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foram avaliados pelo método de disco-difusão, conforme metodologia descrita pela tabela de interpretativa dos halos de inibição para antimicrobianos utilizados em medicina veterinária M3-A3 (CLSI, 2008). Após descongelamento (item 3.3), os isolados bacterianos de *S. aureus* e *S. uberis* foram cultivados em caldo BHI (*brain hearth infusion),* por 24 horas e posteriormente a turbidez foi ajustada com para escala 0,5 de MacFarland. Uma vez ajustada a turbidez do meio de cultivo, a semeadura foi feita por meio de *swab* estéril na superfície de ágar Mueller Hinton para *S. aureus* e para *S. uberis* o ágar Muller Hinton foi acrescido de 5% de sangue de bovino. Os discos

impregnados com antimicrobianos foram aplicados com dispensador de discos (OXOID). As placas foram incubadas à 35ºC e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 18 horas de incubação, com o uso de paquímetro.

Os antimicrobianos testados e suas respectivas concentrações foram: tetraciclina 30 µg, ceftiorfur 30 µg, oxacilina 1 µg, pirlimicina 2 µg , penicilina 10µg , ampicilina 10 µg, enrofloxacina 5 µg, gentamicina 10 µg, cefalotina 30 µg, amoxacilina/ácido, clavulânico 30 µg, penicilina/novobiocina 40 µg, cefalotina 30 µg (OXOID, *Basingstoke, Inglaterra*).

Os resultados de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram expressos em sensível ou resistente, sendo que os isolados que apresentaram sensibilidade intermediária foram considerados resistentes. As zonas de inibição do crescimento (diâmetro) foram medidas em milímetros foram usadas para classificar a sensibilidade/resistência dos isolados em relação aos antimicrobianos de acordo com os critérios do CLSI (2008). (Tabela 1).

Tabela 1 Tabela de interpretação dos diâmetros (mm) dos halos de inibição, com base em recomendações do CLSI*

Antimicrobiano	Disco	Bactéria	Sensível (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)
AMP	10µg	*Staphylococcus spp.*	≥ 29	.	≤ 28
		Streptococcus spp.	≥ 26	19 - 25	≤ 18
PEN	10UN		≥ 29	.	≤ 28
AMA	20 µg/10µg	*Staphylococcus spp.*	≥ 20	.	≤ 19
		Outros (Streptococcus)	≥ 18	14 - 17	≤ 13
OXA	1µg	*Staphylococcus aureus*	≥13	11-12	≤ 10
				.	≤ 17
CEL	30µg		≥ 18	15-17	≤ 14
CEF	30µg	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus uberis*	≥ 21	18 - 20	≤ 17
GEN	10µg		≥ 15	13 - 14	≤ 12
TET	30µg	*Staphylococcus spp.*	≥ 19	15 - 18	≤ 14
		Streptococcus spp.	≥ 23	19 - 22	≤ 18
ENR	5µg		≥ 21	17-20	≤ 16
PIR	2µg	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus uberis*	≥ 13	.	≤ 12
ERI	15µg	*Staphylococcus aureus*	≥ 23	14 - 22	≤ 13
		Streptococcus uberis	≥ 21	16 - 20	≤ 15
PEN-NOV	10 UN/30 µg	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus uberis*	≥ 18	15 -17	≤ 14

AMP : ampicilina, AMA: amoxacilina/ác. clavulânico, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, CEL: Cefalotina, CEF: Ceftiofur, GEN: Gentamicina, TET: tetraciclina, ENR: enrofloxacina, PIR: pirlimicina, ERI: eritromicina, PEN-NOV: penicilina/ novobiocina*Tabela M31-A3 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008)

3.5. Análise estatística

O isolados bacterianos foram classificados de acordo com a capacidade de produção de biofilmes medida através da densidade ótica (OD) das cepas em relação ao cepa do controle negativo (OD_{NC}) em: fraco ($OD_{NC} < OD \leq 2 \times OD_{NC}$), moderado ($2 \times OD_{NC} < OD \leq 4 \times OD_{NC}$) ou forte ($OD > 4 \times OD_{NC}$) produtores de biofilme, de acordo com Stepanović et al. (2003).

Para avaliação da resistência *in vitro* aos antimicrobianos foram utilizados os padrões de diâmetros de halos de inibição, recomendados pelo CLSI (2008). Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, flouroquinolonas, lincosamidas, tetraciclina e penicilina/novobiocina) foram considerados multirresistentes (SCHWARZ et al., 2010).

Para avaliação do efeito da capacidade de formação de biofilme sobre a resistência aos antimicrobianos, foi utilizado o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3 (2012). O modelo misto generalizado foi o seguinte:

$$\text{logit}(pi) = \beta_0 + \beta_1 \times \text{Bio} + \beta_2 \times \text{Bact} + \beta_3 \times \text{Mast} + \beta_4 \times (\text{Bio} \times \text{Bact}) + \beta_5 \times (\text{Bio} \times \text{Mast}) + \text{Rebanho(aleatório)} + \text{Re},$$

onde logit(pi) é a probabilidade do microrganismo apresentar resistência aos antimibrobianos (1 ou 0); β_0 é o intercepto; β_1 refere-se ao coeficiente de regressão para efeito de capacidade de formação de biofilme; β_2 refere-se ao coeficiente de regressão para efeito da espécie bacteriana (*S. aureus* ou *S. uberis*); β_3 refere-se ao coeficiente de regressão para efeito da forma de apresentação da mastite (clínica ou subclínica); β_4 refere-se ao coeficiente de regressão para efeito de interação entre capacidade de formação de biofilme e espécie bacteriana; β_5 refere-se ao coeficiente de regressão para efeito de interação entre espécie bacteriana e forma de apresentação da mastite. Rebanho foi incluído como efeito aleatório. Re refere-se ao resíduo termo do modelo. Foi utilizada distribuição binomial e função logística

4. RESULTADOS

4.1 Capacidade de formação biofilme

De um total de 197 isolados de *S. aureus*, 108 (54,81%) apresentaram capacidade de formar biofilme bacteriano. De forma similar, do total de 119 isolados de *S. uberis*. 64 (53,78 %) dos isolados também apresentaram capacidade de formar biofilmes (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência da capacidade de formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* isolados de mastite clínica e subclínica. .

		Streptococcus uberis			*Staphylococcus aureus*		
Capacidade de formação de biofilme	Forma de mastite	Média OD[2]	n	%	Média OD[2]	N	%
NP[1]	Total	0,008	55	46,2	0,020	84	44,16
	MSC[3]	0,014	14	11,7	0,019	45	22,84
	MC	0,006	41	34,4	0,031	39	19,79
FRACO	Total	0,035	13	10,9	0,029	33	16,75
	MSC	.	.	.	0,024	21	10,65
	MC	0,035	13	10,9	0,038	12	6,09
MODERADO	Total	0,025	30	25,2	0,031	37	18,78
	MSC	.	.	.	0,028	26	13,97
	MC	0,025	30	25,2	0,037	11	5,58
FORTE	Total	0,021	21	17,6	0,057	43	19,28
	MSC	0,005	1	0,8	0,044	19	7,6
	MC	0,030	20	16,8	0,062	24	11,67

1 – NP: Não produtor, 2 – OD: Densidade ótica, 3 – MSC: Mastite subclínica, MC: Mastite Clínica

Dentre os isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica, foram identificados 39 (19,8 %) não formadores de biofilme (NP), 12 (6,1%) com fraca formação (FRACO), 11 (5,6%) com moderada formação (MODERADO) e 24 (11,7%) com forte formação (FORTE). Este resultado indica que os isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica estavam distribuídos principalmente nas categorias NP e FORTE. Nos isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica houve frequência de distribuição mais uniforme, uma vezque 45 (22,8%) isolados foram classificados com NP, 21 (10,6%) FRACO, 26 (13,9%) MODERADO e 19 (7,6%) FORTE (Tabela 2)

Dentre os isolados de *S. uberis* isolados de mastite clínica, foram encontrados 41 (34,4%) classificados com NP, 13 (10, 9%) com formação FRACO, 30 (25,2 %) com formação MODERADA e 20 (16, 8%) com formação FORTE.

4.2. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos e multirresistência

Os antimicrobianos utilizados no teste de sensibilidade *in vitro* foram agrupados de acordo com 7 classes dos princípio ativo: beta-lactâmicos, , aminoglicosídeos, macrolídeos, flouroquinolonas, lincosamidas, tetraciclina e penicilina/novobiocina. Foram realizados 197 testes de susceptibilidade *in vitro* de isolados de *S. aureus e* 119 de *S. uberis.*

A sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *S. aureus* foi > 90% para os seguintes antimicrobianos: amoxacilina/ácido clavulânico, oxacilina, cefalotina, gentamicina, enrofloxacina, pirlimicina, eritromicina, penicilina/novobiocina. Para os demais princípios ativos, a sensibilidade foi de 52,27 % para a tetraciclina, 49% para ampicilina e a menor sensibilidade foi em relação à penicilina (7,1%) (Tabela 3). Quando analisados em conjunto, um total de 90 isolados (45,69%) de *S. aureus* foram resistentes a ambos os antimicrobianos ampicilina e penicilina.

Tabela 3 Frequência de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus e Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina.

Antimicrobianos	*Streptococcus uberis*				*Staphylococcus aureus*			
	S[1]		**R**		**S**		**R**	
	n°	**%**	**n°**	**%**	**n°**	**(%)**	**n°**	**%**
AMP[2]	101	90,00	11	9,8	97	49	100	50,76
AMC	112	90,00	1	0,90	194	98	3	1,50
OXA	16	14,30	96	85,70	194	98	2	1,02
PEN	15	13,50	96	86,50	14	7,1	183	92,89
CEL	112	99,15	1	0,90	192	97	4	2,04
CEF	108	96,40	4	3,80	157	79	40	20,03
GEN	111	98,20	2	1,80	194	99	1	0,51
TET	67	59,80	45	40,2	93	47	104	52,27
ENR	101	90.0	11	9,8	183	92	14	7,03
PIR	95	84,80	17	15,20	196	99	1	0,50
ERI	101	90,20	5	4,50	190	97	5	2,50
PEN-NOV	111	98,20	2	1,80	197	100	0	.

1- S: Sensível, I: Intermediário e R: resistente , 2- AMP : ampicilina, AMA: amoxacilina/ác. clavulânico, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, CEL: Cefalotina, CEF: Ceftiofur, GEN: Gentamicina, TET: tetraciclina, ENR: enrofloxacina, PIR: pirlimicina, ERI: eritromicina, PEN-NOV: penicilina/ novobiocina.

Para os isolados de *S. uberis* a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foi > 90% para ampicilina, amoxacilina/ácido clavulânico, cefalotina, ceftiofur, gentamicina, enrofloxacina, eritromicina e penicilina/novobiocina. As menores frequências de sensibilidade de isolados de

S.uberis foram para oxacilina (14,30%), penicilina (13,5%). Dentre os isolados de *S. uberis*, 52 (46,02%) foram resistentes tanto para aa penicilina quanto para a oxacilina.

Para a avaliação do efeito da capacidade de formação de biofilme sobre a resistência e multirresistência de isolados de *S. aureus* e *S. uberis*, foi utilizado um modelo misto generalizado (**Tabela 4 e 5).**

Tabela 4 Efeito da a capacidade de formação de biofilme, tipo de mastite (MC ou MSC) e patógeno causador (*S. aureus*, *S. uberis*) sobre a resistência e multirresistência aos antimicrobianos

	P-valor				
Multirresistência	Biofilme[1]	Mastite[2]	Bactéria[3]	Bac*Bio[4]	Mastite*Bio[5]
	0,817	0,923	**0,016**	0,162	0,345
Resistência					
AMP	0,1050	**0,0005**	**0,001**	0,8611	0,5992
AMC	0,9913	0,3272	0,7557	0,7016	0,9425
OXA	0,1686	**0,0001**	0,0001	0,4979	0,7898
PEN	0,9620	**0,0137**	0,2346	0,6844	0,7331
CEL	0,4050	0,7397	0,3024	0,2738	0,2579
GEN	0,9828	0,9979	0,9694	0,9987	**0,0001**
TET	0,1731	**0,0025**	**0,0001**	0,2252	0,4063
ENR	0,8468	0,3553	0,3942	0,9390	0,7553
PIR	0,9620	**0,**0234	**0,0137**	0,6844	0,7331
ERI	0,4611	0,9148	0,3243	0,9096	0,6133
PEN-NOV	0,8427	0,8971	0,9051	0,9662	0,9479
CEF	0,5474	0,9243	0,0002	0,6789	0,6829

1: Biofilme: resposta formador ou não formador, 2: Mastite tipo de mastite: Subclínica e Clínica, 3: Bactéria: *S. aureus* ou *S.uberis*, 4:Bac*Bio: Interação entre tipo de patógeno causador e biofilme, 5: Mastite*biofilme: interação entre tipo de mastite (MC ou MSC) e biofilme.

A multirresistência foi atribuída a isolados de *S. aureus e S. uberis* que apresentaram resistência fenotípica a três ou mais classes de antimicrobianos.

Houve diferença estatística entre os isolados de *S. aureus e S. uberis* multirresistentes (*P*=0,016) (**Tabela 4** os isolados de *S. uberis* apresentam maiores chances de serem multirresistentes em relação aos isolados *S. aureus.*

As diferenças entre as médias sobre o risco de resistência e multirresistência em relação a capacidade de formação de biofilme são presentadas na (**Tabela 5**). Analisando os antimicrobianos separadamente, houve efeito da forma de apresentação a resistência à ampicilina apresentou efeito para mastite, sendo que os isolados de mastite subclínica foram 2,7 mais chances de resistência que os de mastite clínica. De forma similar, houve efeito do tipo de patógeno avaliado, sendo que isolados de *S. aureus* apresentaram 4,8 mais chances de resistência que os isolados de *S. uberis*. Em relação à tetraciclina, isolados de mastite clínica

apresentaram 2,3 vezes mais chances de resistência que os isolados de mastite subclínica, enquanto para este mesmo antimicrobiano, isolados de *S. aureus* apresentaram 3,9 vezes mais chances de resistência do que *S. uberis.*

Com relação a sensibilidade à penicilina, houve efeito da forma de apresentação de mastite, sendo que isolados de mastite subclínica apresentaram maior chance de resistência em comparação com a os isolados de mastite clínica. Por outro lado, houve efeito do tipo de patógeno sobre a sensibilidade ao ceftiofur, sendo que *S. aureus* apresentou 7,972 mais chance de resistência do que o *S. uberis*. De forma, isolados de *S. aureus* apresentaram 19 mais chances de resistência ao ceftiofur do que o *S. uberis*.

Tabela 5. Efeito da capacidade de formação de biofilme, tipo de mastite (MC ou MSC) e patógeno (*S. aureus e S. uberis*) sobre o risco de resistência e multirresistência aos antimicrobianos: Parte 2: Médias

	Biofilme		Bactéria		Mastite	
	NP	Produtor	*S.aureus*	*S. uberis*	MC	MSC
Multirresistência	0.039	0.047	0.013[b]	0.133[a]	0.045	0.041
Resistência						
AMP	0,230	0,341	0,465	0,151	**0,191[a]**	**0,395[b]**
AMC	0,0004	0,0003	0,001	0,0001	0,013	0,00001
OXA	0,371	0,083	0,006	0,885	**0,201[a]**	**0,113[b]**
PEN	0,934	0,938	0,934	0,938	**0,941[a]**	**0,930[b]**
CEL	0,006	0,025	0,017	0,009	0,006	0,024
GEN	0,0001	$1,5x\ 10^{-8}$	$8,32x10^{-7}$	$2,47x\ 10^{-6}$	0,00005	3,86x10-8
TET	0,494	0,372	**0,588[a]**	**0,2625[b]**	**0,523[a]**	**0,314[b]**
ENR	0,045	0,051	0,065	0,035	0,038	0,060
PIR	0,011	0,0108	0,037	0,048	**0,037[a]**	**0,003[b]**
ERI	0,032	0,0166	0,024	0,022	0,360	0,014
PEN-NOV	$6,86x10^{-6}$	0,0200	0,00005	0,002	0,00007	0,001
CEF	0,101	0,0750	0,212	0,03	**0,088[a]**	**0,085[b]**

AMP : ampicilina, AMA: amoxacilina/ác. clavulânico, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, CEL: Cefalotina, CEF: Ceftiofur, GEN: Gentamicina, TET: tetraciclina, ENR: enrofloxacina, PIR: pirlimicina, ERI: eritromicina, PEN-NOV: penicilina/ novobiocina

Houve efeito de interação entre capacidade de formação e tipo de mastite apenas sobre a resistência à gentamicina poré, a comparação de médias não foi constatado diferença entre a médias de tipo de mastite e capacidade de formação de biofilme.

A frequência de isolados de *S. aureus* e *S. uberis* foi agrupada em 4 perfis de resistência aos antimicrobianos: somente uma classe, duas, três ou quatro e distribuída de acordo comcapacidade de formação de biofilme (F: Forte, M: moderado, FR: Fraco, NP: não produtor) **(Tabela 7**).

Tabela 7. Frequência de isolados de *S. aureus* e *S. uberis*, distribuídos de acordo com número de classes de antimicrobianos com resistência e com a capacidade de formação de biofilme

			Categorias de Biofilme							
N° de classes de antimicrobianos com resistência			**F**		**M**		**FR**		**NP**	
	Patógeno	**Mastite**	n	%	n	%	n	%	n	%
1	*S. aureus*	MC	18	9,13	8	4,06	7	3,55	33	16,75
		MSC	12	6,09	19	9,64	14	7,10	35	17,76
	S. uberis	MC	9	9,27	18	18,6	9	9,27	12	12,4
		MSC	.	.	.	.	.	.	.	.
2	*S. aureus*	MC	5	2,53	.	.	5	2,53	5	2,53
		MSC	5	2,53	7	3,55	6	3,04	5	2,53
	S. uberis	MC	7	7,21	8	8,24	1	1	11	11,3
		MSC	.	.	.	.	.	.	.	.
3	*S. aureus*	MC	.	.	.	.	.	.	.	.
		MSC	1	0,5	.	.	.	.	1	0,5
	S. uberis	MC	2	2,06	3	3,09	.	.	12	12,37
		MSC	.	.	.	.	.	.	.	.
4	*S. aureus*	MC	.	.	.	.	.	.	.	.
		MSC	4	2,03	.	.	.	.	.	.
	S.uberis	MC	1	1	.	.	.	.	.	.
		MSC	.	.	.	.	.	.	.	.

F: forte, M: moderado, FR: fraco, NP: não produtor

Entre isolados de *S. aureus* que apresentaram multirresistência (3 ou mais classes de antimicrobianos), 83,3 % dos isolados multirresistentes pertenceram a categoria forte de formação de biofilme e 16,6 % dos isolados pertenceram a categoria não formador de biofilme (Tabela 4). A classe dos beta-lactâmicos estava presente em todos isolados de *S. aureus* multirresistentes. Entre os 18 isolados de *S. uberis* que apresentaram multirresistência (3 ou mais classes de antimicrobianos), 66,7% dos isolados multirresistentes pertenceram a categoria de não formador de biofilme, 16,6% dos isolados pertenceram a categoria forte formador de biofilme e 16,6% a categoria moderado.

Dentre os isolados de *S. uberis* classificados como fortes produtores de biofilme, 3 foram multirresistentes (2,06%), enquanto os isolados com moderada capacidade de formação de biofilme 3 (3,09%) foram multirresistentes e a categoria não produtor de biofilme 12 (12,4%) isolados multirresistentes. As classes de antimicrobianos mais frequentemente associadas com a multirresistências de isolados de *S. uberis* foi a dos beta-lactâmicos (100% dos isolados) e a tetraciclina (94,73 % dos isolados). Não houve efeito da classe de antimicrobianos causador de multirresistência e a formação de biofilme.

5. DISCUSSÃO

A capacidade de formação de biofilmes é um fator crítico de virulência de vários patógenos bacterianos, inclusive para os patógenos causadores da mastite como o *S. aureus*, *Escherichia coli* e *S. uberis* (MELCHIOR et al., 2011).

No presente estudo, a frequência de isolados de *S. aureus* que apresentaram capacidade de formação de biofilme foi de 54,81%, considerando-se o conjunto de todas as classes (forte, fraco e moderado). Esta alta frequência de isolados de *S. aureus* com capacidade de formação de biofilme foi maior do que o descrito por Fox et al., (2005), em isolados de *S. aureus* dos EUA (41%). De forma similar, Lee et al., (2014) em estudo realizado no Brasil descreveram 45,2% de isolados de *S. aureus* com capacidade de formação de biofilme. Por outro lado, uma maior frequência de capacidade de formação de biofilme (62,5%) foi descrita por Aslantas et al., (2016) em isolados de *S. aureus* na Turquia.

Os resultados dos estudos previamente publicados indicam que não há um padrão estabelecido quanto ao percentual de isolados de *S. aureus* de origem de mastite bovina com capacidade de formar biofilme. Esta variação de resultados pode ser explicada por diferenças na metodologia como uso de glicose, soro de sangue bovino e enzimas proteolíticas (ROHDE et al., 2005; COELHO et al. 2008) que podem influenciar a expressão dos genes que desencadeiam a formação do biofilme. Um estudo conduzido por Melchior et al., (2009) utilizou meio TSB suplementando com glicose e TSB suplementado com soro de leite bovino e foram observadas diferenças significativas ($P<0,005$), uma vez que houve aumento da formação de biofilme quando o TSB foi suplementado com soro de leite. Outros estudos já descreveram que a expressão ou não da formação de biofilme pode ser influenciada dos compostos lácteos na expressão de genes de formação de biofilme. Tal influência na produção de biofilmes já foi demonstrada para *S. aureus* (Melchior et al., 2009), mas também para outras espécies bacterianas, como *Streptococcus uberis* (VARHIMO et al., 2011).

No presente estudo, a maioria dos isolados de *S. aureus* (54,81%) foram capazes de formar biofilme mas, não houve diferença ($P= 0,463$) entre isolados formadores de biofilme e não formadores em relação as resistência aos antimicrobianos. Entretanto, uma das limitações deste estudo é que, no momento em que os testes *in vitro* de resistência aos antimicrobianos foram realizados os isolados de *S. aureus* (formadores e não formadores de biofilme) não se encontravam em condição ambiental que permitisse a formação de biofilme. Uma das explicações para a ausência de associação no presente estudo seria que o biofilme age como uma barreira física para o contato entre o antimicrobiano e a bactéria (condição ausente no

momento do teste *in vitro*), o que seria um fator que reduz a ação dos antimicrobianos facilitando que as infecções se tornem crônicas. Outros estudos *in vitro,* relataram que as bactérias em condições de biofilme são de 10 à 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que bactérias planquitônicas (livres) (OLSON et al., 2002). Um estudo comparou os isolados bacterianos em condições de biofilme e também em condição livre (planquitônicas) e os isolados em biofilme apresentaram maiores concentrações inibitórias de antimicrobianos (MELCHIOR et al., 2006).

Para *S. uberis*, 52,93% dos isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme. Na literatura indexada, foi encontrado apenas um estudo sobre formação de biofilme por *S. uberis.* Verhimo et al., (2011) descreveram que apenas 2 de 10 isolados de *S. uberis* apresentaram capacidade de formação de biofilme. Ainda de acordo com Verhimo et al., (2011), a adição de pequenas quantidades de leite na microplaca durante o teste *in vitro* aumentou a quantidade de isolados que apresentaram capacidade de formação de biofilme, os quais inicialmente foram classificados como não formadores. Na sequência do ensaio *in vitro*, foi avaliada a adição de proteinase K e foi observada a completa dissolução do biofilme formado. A dissolução do biofilme após a adição da proteinase foi sugerida como sendo indicativo de que a formação de biofilme no *S. uberis* é mediada por proteínas e aqueles autores concluíram que as atividades de proteínas extracelulares foram um ponto fundamental na formação de biofilme em *S. uberis.* No presente estudo, não foi utilizada a adição de leite na avaliação da formação de biofilme e mesmo assim à maioria dos isolados formaram biofilme, o que sugere que outros mecanismos pode estar envolvidos na formação de biofilme por *S. uberis.* Foi descrito que *S. uberis* possui uma molécula de adesão e internalização chamada SUAM, que está presente em isolados de diversas localizações geográficas (Yuan et al., 2014). A aderência e internalização é o mecanismo central da patogênese do *S. uberis* em infecções intramamárias (Almeida et al., Entretanto, devido ao número limitado de estudos envolvendo a formação de biofilme pelo *S. uberis,* sugere-se que estudos adicionais sejam feitos para elucidar os fatores envolvidos na formação de biofilme, os quais ainda não são conhecidos nessa espécie. Não houve associação entre a frequência de isolados de *S. uberis* formadores de biofilme e a resistência aos antimicrobianos, possivelmente devido as limitações estabelecidas pelo uso da técnica *in vitro*, como discutido anteriormente.

A mastite bovina é a causa mais comum de uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros e a resistência dos patógenos causadores de mastite aos antimicrobianos tem recebido interesse nos últimos anos (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004). Isso ocorreu devido ao elevado número de tratamentos com taxas de curas baixas e também relacionada ao risco de transmissão de

genes de resistência para patógenos causadores de doenças em humanos (ERSKINE et al., 2002)

No presente estudo, para avaliar a resistência de *S. aureus* e *S. uberis* aos antimicrobianos, foi escolhido o método de difusão em disco, devido a sua praticidade, velocidade e economicidade. A sensibilidade antimicrobiana de *S. aureus* (n=197) foi > 92% para a maioria dos antimicrobianos testados, com exceção da penicilina, ampicilina e tetraciclina. A sensibilidade foi considerada baixa em 3 antimicrobianos: ampicilina (49,2%), a tetraciclina (47,2%) e penicilina (7,1%). Outros estudos conduzidos no Brasil relataram baixa sensibilidade de *S. aureus* aos antimicrobianos. Costa et al., (2013), no estado de Minas Gerais (n=352 isolados) em 35 rebanhos, relatou baixa sensibilidade para penicilina (20%), ampicilina (20%). Parada et al.,(2011), no estado do Paraná (n=71 isolados, de 12 rebanhos) relatou sensibilidade de 24% para penicilina, enquanto Nader Filho et al., (1992) relatou 13,7% e 1,7%, de sensibilidade para ampicilina e penicilina.

Outros estudos relataram diferenças significativas de sensibilidade à penicilina em isolados de *S. aureus* de mastite clínica e subclínica em diferentes países. Na Turquia, Guler et al., (2005) descreveram em amostras de mastite clínica de 235 rebanhos (n=265 isolados), que 36,7% dos isolados de *S. aureus* foram sensíveis à penicilina, enquanto que no Kenya, Shintandi et al., (2004) em cerca de 500 rebanhos pequenos (+/- 20-40 vacas em lactação), (n= 201 isolados) relataram sensibilidade de 30,8%. No Iran, Jamali et al., (2014) (n=43 isolados) descreveram 14% de sensibilidade *in vitro* à penicilina. Alguns países apresentam maiores índices de sensibilidade de *S. aureus* à penicilina. Por exemplo, Pitkala et al., (2004) descreveram que 47,9% dos isolados testados foram sensíveis à penicilina. Na Argentina Gentilini et al., (2000) (n=206 isolados) relataram 59,7% de sensibilidade em isolados de *S. aureus* provenientes de casos de MC e MSC e Pengov et al., (2003) na Eslovênia (n=1282 isolados de bovinos e n=92 isolados de ovinos) em 18 rebanhos descreveram (61,8 %) de sensibilidade à penicilina. Em um estudo conduzido em diferentes países por Vintov et al., (2003), 28% dos isolados de *S. aureus* na Irlanda (n=42) apresentaram sensibilidade, 32,7% na Inglaterra (n= 100) e (0% nos Estados Unidos (n= 56). Outro estudo envolvendo 11 países e 811 isolados de *S. aureus* de casos de MC e MSC concluiu que a prevalência e resistência dos isolados a determinados antimicrobianos estava relacionado a frequência uso de antimicrobianos em cada região (DE OLIVEIRA, 2000).

No presente estudo, os isolados de *S. aureus*, *Escherichia coli* e *S. uberis* apresentaram baixa sensibilidade ao santimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, particularmente penicilina e ampicilina. Resultados similares foram descritos em outros países, uma vez que

estes antimicrobianos são comumente utilizados em vários países para tratamento de mastite (BAL,,2010).

No presente estudo, 82 isolados de *S. aureus* (41,62%) foram resistentes à ampicilina e a penicilina sendo que todos os isolados que foram resistentes ampicilina também foram resistentes à penicilina. De acordo com Guler et al., (2005), 41,1% dos isolados de *S. aureus* foram resistentes à penicilina e ampicilina. Da forma similar, Brito et al., (2001) descreveram resistência em 35% dos isolados e Rabello et al., (2005) relataram resistência em 55% dos isolados em ambos os antibióticos. Considerando os resultados dos estudos prévios (Guler et al., 2005; Brito et al., 2001; Rabello et al., 2005) pode-se sugerir que houve pouca alteração da resistência de *S. aureus* à penicilina e ampicilina nesses últimos 10 anos. Um estudo realizado nos EUA avaliou a resistência aos antimicrobianos durante 6 anos (ERSKINE et al., 2002). A resistência de *S. aureu*s em relação a penicilina em 1994 (61,6%) sofreu redução nas observações realizadas no ano de 2000 (49,6%) A diminuição da resistência do *S. aureus* ao longo do período do estudo sugere que um maior controle do uso de antimicrobianos pode ter um efeito benéfico na diminuição da resistência.

Dentre as espécies de *Streptococcus*, *S. uberis* apresenta maior grau de resistência aos antimicrobianos quando comparado às espécies *S. dysgalactiae* e *S. agalactiae* (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002). No presente estudo, foram observados elevados índices de resistência de *S. uberis* para oxacilina (85,7 %), penicilina (86,5 %), tetraciclina (40,2 %) e pirlimicina (15,2%) . Em estudo realizado nos EUA, também foi descrita alta resistência de *S. uberis* para oxacilina (41,7%), tetraciclina (45,2%), pirlimicina (20,1%) (ERSKINE et al., 2002). Este mesmo estudo constatou que em 6 anos de acompanhamento da sensibilidade das cepas de *S. uberis* (481 isolados) aos antimicrobianos, aumentou para gentamicina, oxacilina, pirlimicina e diminuiu para penicilina, sugerindo que não ocorreu aumento generalizado da resistência de *S. uberis*. No presente estudo, a resistência dos isolados de *S. uberis* em relação a oxacilina e tetraciclina foram maiores que os observados por Erskine et al., (2002). Um estudo conduzido em Portugal encontrou índices de resistência diferentes, sendo que 27% dos isolados apresentaram resistência à eritromicina, 53,3% para pirlimicina, 60% para tetraciclina, 80% para gentamicina (RATO et al., 2013), diferindo do presente estudo, no qual observou-se baixos índices de resistência dos isolados para eritromicina (4,5%) e gentamicina (1,8%).

Considerando os resultados de estudos em diferentes países, existe grande variações quanto à resistência de isolados bacterianos causadores de mastite em relação a diferentes antimicrobianos, podendo variar de 7 a 99%. Tais resultados sugerem que fatores locais como frequência de uso de antimicrobianos, legislação sobre de venda de antimicrobianos e

conscientização dos técnicos e produtores podem estar envolvidos quanto a variação de resultados (PITKALA et al., 2008; SUPRÉ, et al., 2014). Também as variações nos índices de resistência podem ocorrer em regiões ou rebanhos devido à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004)

A resistência aos antimicrobianos pode variar conforme a região ou país onde é realizado o estudo, tanto para isolados de *S. aureus* quanto *S. uberis*, o que sugere a importância de monitorar o avanço da resistência aos antimicrobianos em cada país e a eficiência da adoção de medidas para controlar a mastite. O monitoramento da resistência de bactérias isoladas a partir da mastite bovina é necessário para identificar tendências de aumento da resistência de algum patógenos à princípios ativos específicos, o que pode permitir o uso mais racional e prudente dos antibióticos (THOMAS et al., 2015).

Considerando os resultados de multirresistência aos antimicrobianos, os isolados de *S. aureus* e *S. uberis* foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência à 3 ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARTZ et al., 2010). Neste estudo, foram encontrados baixos índices de multirresistência de *S. aureus* (1,52%), porém índices mais elevados foram observados para *S. uberis* (15,9%). Para os isolados de *S. aureus*, a resistência à classe dos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) foi identificada em todos os isolados com multirresistência. Por outro lado, para o *S. uberis*, a maior frequência de isolados multirresistentes foi observado para as classes dos beta-lactâmicos e tetraciclinas. Um recente estudo realizado na Turquia por Aslantas et al., (2016) observou alta correlação entre a resistência *in vitro* de isolados de *S. aureus* e a expressão de gene de resistência (blaZ) para os beta-lactâmicos (100%). No entanto, não existe consenso entre os estudos sobre a definição de "multirresistência", e desta forma, como consequência esse termo é utilizado também na resistência à multidrogas sem levar em consideração se esses antimicrobianos são de uma mesma classe ou não (SWARTZ et al., 2010).

Mesmo com taxa de multirresistência observada no presente estudo para *S. aureus* (1,52%) e para *S. uberis* (15,9%), a classe dos beta-lactâmicos foi identificada como uma das principais classes de antimicrobianos resistentes tanto em *S. aureus* quanto *S. uberis*. Resultados diferente foram encontrados por Santiago-Neto et al., (2014) no Rio Grande do Sul, no qual 40,35% dos isolados de *Staphylococcus* coagulase-postiva apresentaram resistência a mais de 3 classes de antimicrobianos e (27, 8%) dos isolados de *Streptococcus spp* também apresentaram multirresistência, e assim como no presente estudo, esses autores relatam que a classe dos beta-lactâmicos estava presente em (44%) dos isolados resistentes.

Os resultados do presente estudo sugerem que devem ser tomadas medidas preventivas para regulamentar a venda de antimicrobianos no Brasil, uma vez que o uso imprudente e com ausência de critérios pode levar, no médio e longo prazo, a enormes prejuízos, quanto à eficiência de ação do uso de diversos princípios ativos disponíveis no mercado.

6. CONCLUSÃO

S. aureus e *S. uberis* apresentaram alta capacidade de formação de biofilme, mas não houve correlação entre o tipo de da mastite (clínica e subclínica) e a capacidade de formar biofilme. Em relação a sensibilidade *in vitro* dos isolados de *S. aureus* e *S. uberis* aos antimicrobianos, a maioria dos isolados apresentou baixa sensibilidade à penicilina, ampicilina e tetraciclina. De forma similar, não foi observada correlação entre a capacidade de formação de biofilme e a sensibilidade aos antimicrobianos.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, H. R. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2003. 1034 p.

AARETRUP, F. M.; JENSEN N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.2, p 307-312, 1997.

ALMEIDA, R.A., MATTHEWS, K.R., OLIVER, S.P. Eukaryotic and prokaryotic cell functions required for invasion of S. aureus into bovine mammary epithelial cells. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 44, p.139-145, 1997.

ALMEIDA, R.A., MATTHEWS, K.R., CIFRIAN, E., GUIDRY, A.J., OLIVER, S.P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary gland epithelial cells**. Journal of Dairy Science**, v.79, p.1021-1026, 1996.

ALMEIDA, R. A. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). **Veterinary Microbiology**, v. 115, n 1/3, p. 183-191, June 2006.

ALMEIDA, R. A.; LUTHER, D. A.; OLIVER. S. P. Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. **FEMS Microbiological Letter**. v.178, p.81-85, 1999.

ALMEIDA, R. A., AND S. P. OLIVER. 2001. Role of collagen in adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells**. Journal Veterinary Medicine B Infection Diseases Veterinary Public Health.** v. 48, p.759-63, 2001.

ALMEIDA, R,; KERRO DEGO, O.; HEADRICk, S. I. LEWIS. M. J. Role of Streptoccoccus uberis adhesion molecule in the pathogenesis of Streptococcus uberis masitis. **Veterinary Microbiology**. v. 179, p.332-335, 2015.ANVISA. **Interpretação de dados microbiológicos. 2008.** Disponível em: < http: //www. anvisa.gov.br/servicosaude/controle /rede_rm/ cursos/ atm_racional/modulo2 /metodos5.htm, 2008>. Acesso em: 2 mar. 2016.

ASLAM. S, DAROUICHE, R.O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. **International Journal Artificial Organisms**. v.34,n.9, p.752-758, 2011.

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

BAUER, A. W.; KIRBY,V.M.M ; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical. Pathology**. v.45, p.493–496, 1966.

BAL, E. B. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci bovine subclinical mastitis cases. **Journal of Microbiology**. v 48. n. 3, p 267-274, 2010.

BARKEMA, H. W., Y. H. SCHUKKEN, T.J.G.M. LAM, M. L. BEIBOER, H. WILMINK, G. BENEDICTUS, AND A. BRAND. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count**. Journal of Dairy Science**. v.8, p.411 419, 1998.

BARTLETT, P.C. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. **Journal of Dairy Science**. v.74, p.1561-1572, 1991.

BASELGA, R., ALBIZU, I., AMONERA, B. S. aureus capsule and slime as virulence factors in ruminants. **Veterinary Microbiology,** v.39 p.195-204, 1994.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia,** v. 16, n. 4, p 383-407, 2011.

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

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: Na evolving disease. **Veterinary Journal**. v. 164, n. 2. p. 116-128, 2002.

BRITO, M. A. V. P.;BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p 531 – 537, 2001.

BRITO, M. V. P. Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa Gado de leite, p.2. 2009.

BRITO, M. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Circular Técnica Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG, n. 44, p. 1, 2005.

BROWEY, R. W.; EDMONSON, P. Mastitis control in dairy herds. 2. Ed. CAB International, p. 266, 2010.

BRADLEY, A. J.; DE VKIEGHER, S.; GRENN, P.; LARROSA, P., PAYNE,B.; SCHMITT, E. An investigation of the dynamics of intramammary infections acquired during the dry period on European dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 98 p. 6029-6047, 2014**.**

CHRISTNER, M., FRANKE, G.C., SCHOMMER, N.N., WENDT, U., WEGERT, K., PEHLE, P. The giant extracellular matrix-binding protein of Staphylococcus epidermidis mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. **Molecular Microbiological**. v.75, p.187-207, 2010.

CIFRIAN EA, GUIDRY AJ, O'BRIEN CN AND MARQUARDT WW. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of S. aureus to cultured teat, ductular and secretory mammary epithelial cells**. Research in Veterinary Science**, v. 58, p. 20-25, 1995.

CIFRIAN EA, GUIDRY AJ, O'BRIEN CN, NICKESON SC AND MARQUARDT WW. Adherence of S. aureus to cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**. v.77, p. 970-983, 1994.

CIOFU O, RIIS B, PRESSLER T, POULSEN HE, HØIBY N. Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy,** v. 49, f. 6, p. 2276-2282**,** 2005

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteenth informational Wayne, PA, USA: CLSI 2008. Supplement M100-S18.

CLUTTERBUCK, A.L. WODDS, E.J., KNOTTENBELT, D,C.,CLEGG, P.D. COCHARANE, C. A., PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**. v. 121 p. 1-17, 2007.

COLEMAN, G.; ABAS-ALLI, B. Comparison of the pattern of increase in alpha-toxin and total extracellular protein by S. aureus (wood 46) grown in media supporting widely differing growth characteristics**. Infection and Immunity**, v. 17, p. 278-281, 1977.

CONSTABLE, P. D., DAWN, E., MORIN, D. E. Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions**. Veterinary Clinic North America Food Animal Practice.** v. 19, p. 139-155, 2003.

COSTERTON, J.W, IRVIN RTAND CHENG K-J. The role of bacterial surface structures in pathogenesis**. CRC critical Reviews in Microbiology**, v.8, p.303-338, 1981.

COSTERTON,J.W, LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL D. E., KORBER D. R., H.M. LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**. v.49, p.711–745, 1995.

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

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista. Educação Continuada**. CRMV, São Paulo, v.1, p.3-9, 1998.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v.49, p. 711-745, 1995

CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., PENADÉS, J.R. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p 2888-2896, 2001.

CULLEN, G. A. The ecology of *Streptococcus uberis***. British Veterinary Journal**. v. 339 p.122:333, 1966.

DE OLIVEIRA, A.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureu*s isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n.4, p. 855-862, 2000.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**., v.15, p 167-193, 2002.

DRIFFIELD K, MILLER K, BOSTOCK M, O'NEILL AJ, CHOPRA I. Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, f. 5, p. 1053 – 1056, 2008.

DÜRR, J. W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. dos. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2004.cap. 2, p. 38-55.

ELKINS, J. G, HASSETT, D. J.,STEWART, P.S.SCHWEIZER, H. P. MCDERMONTT, T.R. Pseudomonas auruginosa biofilm resistente to hydrogen peroxide: protective role of catalase. **Applied Environmental Microbiology**. V. 65. P 4594-4600, 1999.

EFSA. 2011. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β-lactamases and/or AmpC β-lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 9:2322. Accesso: 15 Janeiro, 2014.http://www.efsa.europa. eu/ en/efsajournal/doc/2322.pdf.

ERSKINE, R. J.; WALKER, R. D.; BOLIN, C. A.; BARTLETT, P. C.; WHITE, D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period**. Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1111-1118, 2002.

FANG, W., R. A. ALMEIDA, AND S. P. OLIVER. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. **American Journal Veterinary Research**.v. 61 p**.** 275-279, 1999.

FEY, P.D, OLSON, M.E. Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. **Future Microbiology** .v. 5, p. 917–933, 2010.

FETROW, J. Mastitis: an economic consideration. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Atlanta., GA; p. 3-47, 2000

FOWLER, J.R.V.G., FEY, P.D., RELLER, L.B., CHAMIS, A.L., COREY, G.R., RUPP, M.E. The intercellular adhesin locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. **Medical Microbiol Immunology**.v.189, p.127-131, 2001.

FOX, L.K., ZADOKS, R.N., GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary. Microbiological**. v.107, p. 295–299, 2005

GENTILINI, E., G. DENAMIEL, P. LLORENTE, S. GODALY, M. REBUELTO, AND O. DEGREGORIO. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina**. Journal of Dairy Science**.v.83, p.1224–1227, 2000

GEOGHEGAN, J.A., CORRIGAN, R.M., GRUSZKA, D.T., SPEZIALE, P., O'GARA, J.P., POTTS, J.R. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 192, p. 5663-5673, 2010.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.;BEURON, D.C.;ARCARI, M. A.; LEE, S.H.; MARTINS, C.M.M.R.; JUNIOR, J.P.; SANTOS, M. V. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. The Veterinary Journal. v. 209, p. 87-92, 2016.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B.; KRUSE, Hilde. **Guia de antimicrobianos em veterinária.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

GUERIN-FAUBLEE, V.; TARDY, F.; BOUVERRON, C.; CARRET, G. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, n.3, p. 219-226, 2002.

GULER, L; OK, U.; GUNDUZ,K.; GULCU, Y.; HADIMLI, H. H. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3149-31-54, 2015.

HALASA, T., K. HUIJPS, O. OSTERAS, AND H. HOGEVEEN. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly.** v.29, p.18–31, 2007.

HÉBERT, A., SAYASITH, K., SÉNÉCHAL, S., DUBREVIL, P., LAGACE, J. Demonstration of intracellular *S. aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters, v.**193, p. 57-62, 2000.

HENSEN, S.M., PAVICIC, M.J., LOHUIS, J.A., POUTREL, B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *S. aureus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.418-429, 2000.

HØIBY N, JOHANSEN HK, MOSER C, SONG ZJ, CIOFU O, KHARAZMI A. Pseudomonas aeruginosa and the biofilm mode of growth**. Microbes and Infection**, v. 3, n. 1,p. 23-35, 2001.

HORTET, P.; SEEGERS, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows**. Preventive Veterinary Medicine**. v.37,p. 1-20, 1998.

HILLERTON, J. E., M.F.H. SHEARN, R. M. TEVERSON, S. LANGRIDGE, AND J. M. BOOTH. . Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England. **Journal Dairy Research**. v .60, p. 31–41, 1993.

HOGAN, J. S., K. L. SMITH, K. H. HOBLET, P. S. SCHOENBERGER, D. A. TODHUNTER, W. D. HUESTON, D. E. PRITCHARD, G. L. BOWMAN, L. E.HEIDER, B. L. BROCKETT, AND H. R. CONRAD. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds**. Journal of Dairy Science.** v.72, p 1537- 1547, 1989.

HILLERTON, J.E., WEST, J.G.H.SHEARN, M.F.H. The Cost of Summer Mastitis. **Veterinary Record .** v. 131, p.315-317, 1992.

HILLERTON, J. E.,BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. **Journal Applied Microbiology**, v. 98, p. 1250-1255, 2005.

JOHNSEN, L.B., POULSEN, K., KILIAN, M., PETERSEN, P. Purification and cloning of a streptokinase from Streptococcus uberis. **Infection Immunity**. 67, p. 1072–1078, 1999.

JAYARAO, B. M., B. J. BASSAM, G. CAETANO-ANOLLES, P. M. GRESSHOFF, AND S. P. OLIVER. . Subtyping of Streptococcus uberis by DNA amplification fingerprinting. **Journal Clinical Microbiology**. v.30, p. 13471350, 1992.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. *Short communication*: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 2226-2230, 2014.

KLOOS, W. E; BANNERMAN, T. L. Update on clinical-significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p117-140, 1994.

KOREM M, GOV Y, KIRAN MD, BALABAN N. Transcriptional profiling of RNA III activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. **Infection Immunity**. v.73, p.6220-6208, 2005.

KOBAYASHI, N., BAUER, T. W., TUOHY, M.J., FUJISHIRO, T., PROCOP, G.W. Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant. **Clinical Orthopedics and related Research**. v. 475, p. 210-213. 2007.

KOSSAIBATI, M.A., ESSLEMONT, R.J. The costs of production diseases in dairy herds in England, **Veterinary Journal**. v. 154, p.41–51, 1997.

LAGO, A., GODDEN, S. M.; BEY, R., RUEGG, P. L., LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. **Journal of Dairy Science**. v. 94. P. 4457-4467, 2011.

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 43, n. 6, p. 507 - 515, 1991.

LAMMERS, A., NUIJTEN, P.J.M., SMITH, H.E. The fibronectin-binding proteins of S. aureus are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 103-109, 1999.

LARSEN, H.D, HUDA A., ERIKSEN, N.H.R., JENSEN, N.E. Difference between Danish bovine and human S. aureus isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 153-162, 2000.

LEE, S. H. I.; MANGOLIN, B. L.C. GONÇALVES, J. L. NEEFF, D.V.; SILVA, M. P.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 1812-1816, 2014.

LEIGH, J. A. Vaccination with the plasminogen activator from Streptococcus uberis induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. **Vaccine Rochester**. v. 17, n. 7/8, p. 851-857, 1999.

LOSINGER, W.C. Economic impacts of reduced milk production associated with an increase in bulk-tank somatic cell count on US dairies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 226, p. 1652-1658,2005.

MCDOUGALL, S. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. **The New Zealand Veterinary Journal**. v.46, p.226 232, 1998.

MELCHIOR, M. B., VAARKAMP, H., FINK-GREMMELS, J., Biofilms: role in recurrent mastitis infections? **Veterinary Journal**, v. 171, p 398-401, 2006.

MELCHIOR,M. B. M; VAN OSCH H.J.; LAM, T.J.G.M.; VERNOOIJ, J.C.M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, F. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. **Journal of Dairy Science**. v.94, p. 5926-5937, 2011.

MERINO, N., TOLEDO-ARANA, A., VERGARA-IRIGARAY, M., VALLE, J., SOLANO, C., CALVO, E. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* **Journal Bacteriology**. v.91, 832-843, 2009.

MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency I biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. **Current Opinion Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 255-261, 2003.

NADER FILHO, A. FERREIRA, L. M., DO AMARAL, L. A. ROSSI JUNIOR, O. D. OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p 1-4, 2007.

OLSON, M.E: CERI, H.;, MORCK, D.W.; BURET, AG, READ RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics**. Canadian Journal Veterinary Research** v. 66 p.86–92, 2002.

OSTERAS, O., EDGE, V. L., MARTIN, S. W. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 1221-1231, 1999.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OLIVER, S.P.; MURINDA S. E.; JAYARAO, B. M. Impact of antibiotic use in adult cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. **Foodborne Pathogenesis Disease**, v. 8, n.3,p. 337-355, 2011.

OLIVER. S. P.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK. S. J.; MOOREHEAD. H.; LUNN. H. H. DOWLEN, JOHSON. D. L.; LAMAR., K.C.; CHESTER., S. T.; MOSELEY., W. M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 87. p. 2393-2400. 2004.

OLIVER A, CANTON R, CAMPO P, BAQUERO F, BLAZQUEZ J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. **Science**. v.288:1251–1253, 2000.

OLIVER, S.P., GILLESPIE, B.E., HEADRICK, S.J., LEWIS, M.J.,DOWLEN, H.H.Prevalence, risk factors, and strategies for controlling mastitis in heifers during the periparturient period. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. v.3, p.150–162, 2005.

O'GARA JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. **FEMS Microbiology Letters**. v.270, 179-188, 2007.

OTT, S.L. **Costs of herd-level production losses associated with subclinical mastitis in U.S. dairy cows**. In. NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 38, Arlington, p.152-153, 1999.

PARADA, J. L.; GONÇALVES, D.; VANETE, T. S.; LIMA, M. SCCOL, C. R. Bovine mastitis in the metropolitan area of Curitiba: Antibiotic Resistance and antimicrobial control f the infection**. Brazilian archives of biology and technology**. v. 54, p. 709-716, 2011.

PARKER. K. I.; COMPTON, C. ANNISS, F. M.; WEIR, A.; HEUER, C.; MECDOUGALL, S. Subclinical e clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 207-218, 2007.

PATEL, D., R. A. ALMEIDA, J. R. DUNLAP, AND S. P. OLIVER. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiological** v. 137, p. 297-301, 2009.

PANKEY, J.W., PANKEY, P.B., BARKER, R.M., WILLIAMSON, J.H., WOOLFORD, M.W., The prevalence of mastitis in primiparous heifers in eleven Waikato herds. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 44, p. 41-44, 1996.

PENGOV, A.; CERU, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 3157-3163, 2003.

PHUEKTES, P., P. D. MANSELL, R. S. DYSON, N. D. HOOPER, J. S. DICK, AND G. F.BROWNING. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. **Journal Clinical Microbiological**.v.39, p. 1460–1466, 2001.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack**. A strategy to combat mastitis. Babson Brothers Illinois: Babson Brothers Co., 1991. 150p.1ed.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Edição brasileira: Milkbizz, 2002. 200 p.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial ressistence**. Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.

PITKALA, A.; KOORT, J.; BJORKROTH, J. Identification and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 4075-4081, 2008.

POL, M., RUEGG P. L. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**. 90, , p. 262-273, 2007.

RABIEE, A. R., LEAN, I. J. The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p, 6915- 6931, 2013.

RATO, M. G.; BEXIGA, R.; FLORINDO, C.; CAVACO, L. M. VILELA, C. L.; SANTOS-SANCHES. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastites. **Veterinary Microbiology**. v. 161, p. 286-294, 2013.

ROY. J. P.; DESCOTEAUX. L.; TREMBLAY., D.; BEAUDRY.; F. ELSENER.,J. Efficacy of a 5- day extended therapy program during lactated with *Staphylococcus aureus*. **Canadian Veterinary Journal.** v. 50, p. 1257-1262, 2009.

RUEGG, P. L. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production**. Journal Dairy Science.** v. 86, p. E1-E9, 2003.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. et al. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Science Veterinary**, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SANTOS, M. V. e FONSECA, L. F. L. Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole. 2006. 314 p.

SEGURA, M.; GOTTSCHALK, M. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1157-1188, 2004.

STEWART, P. S.; COSTERTON, W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-8, 2001.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **Journal Medical Microbiological**. v. 292, p. 107-113, 2002.

SALASIA, S.I.O. Comparative studies on phenotypic and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hasse in Germany. **Journal Veterinary Science**., v. 5, p 103-109, 2004.

STEWART, P.S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v.40, p.2517– 2522, 1996.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STEWART. P. S.; COSTERTON. J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet.** V. 358, p. 135-138, 2001.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p. 79-89, 1994.

SCHROEDER, K., JULARIC, M., HORSBURGH, S.M., HIRSCHHAUSEN, N., NEUMANN, C., BERTLING, A. Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. **PLOS One**. v. 4, p. 7567-7581, 2009.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**. v. 9, p.222-227, 2001.

SWINKELS, J.M., COX, P., SCHUKKEN, Y.H. , LAM, T. J.G. M. Efficacy of extended cefquinome treatment of clinical *Staphylococcus aureus* mastitis**. Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4983- 4992, 2013.

SCHWARZ, S; SILLEY, P.; SIMJEE, S; WOODFORD, N; VAN DUJIKEREM, E; JOHNSON, A. P; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiological**. v. 141. p. 1-4, 2010.

SCHWARZ, S., C. KEHRENBERG, and T. R. Walsh .Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production**. International Journal Antimicrobial Agents** v.17p.431–437,2001.

SPINOSA, H. S., GONIAK, S.L., BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 5° ed. Guanabara-Koogan., 2011.

SINGER, R. S., REID-SMITH, R., SISCHO, W. M. Epidemiological perspectives on antibiotic use in animals**. Preventive Veterinary Medicine**. V. 53, p. 103-105, 2006.

SHITAND, A.; STERNESJO, A. Prevalence of multidrug resistant Staphylococcus aureus in milk from large-and small-scale producers in Kenya. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 4145-4149, 2004.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International **Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p.107-113, 2002.

SUPRÉ, K.; LOMMELEN, K.; DE MEULEMEESTER, L. Antimicrobial susceptibility and distribution of inhibition zone diameters of bovine mastitis pathogens in Flanders, Belgium. **Veterinary Microbiological**. v. 171, p. 374-381, 2014.

TETZ, G.V.; ARTEMENKO, N.K., TETZ, V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics**. Antimicrobial Agents Chemother**.v.53, p.1204-1209, 2009.

TOMAZI, T, GONÇALVES, J. L., BARREIRO, J. R. ARCARI, M.A., SANTOS, M. V. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science.** v. 98, p. 3071-3078, 2015.

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, p. 234-246, 2013.

TODHUNTER, D.A. SMITH, K.L. HOGAN. J.S. Environmental streptococcal intramammary infection of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2366-2374, 1995.

THOMAS, V.; JONG, A.; MOYARERT, H.; SIMJEE, S.; GARCH, F.; MORRISSEY, I.; MARION, H,; VALLE, M. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 46, p. 13-20, 2015.

VARHIMO, E., P. VARMANEN, A. FALLARERO, M. SKOGMAN, S. PYÖRÄLÄ, A. IIVANAINEN, A. SUKURA, P. VUORELA, AND K. SAVIJOKI**.** Alpha- and β-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. **Veterinary Microbiological**. v. 149, p**.** 381-389, 2011.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F. M.; ZINN, C. E. OLSEN, J. E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 133 -147, 2003.

WANG, Y., WU, C.M., LU, G.W., REN, N, CAO, X., Y., SHEN, J.Z. Macrolide lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**. v. 12, p. 118-120, 2008.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos**, v. 1, n. 4, p 1-6, 2004.

WERNER E, ROE F, BUGNICOURT A, FRANKLIN MJ, HEYDORN A, MOLIN S. Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Applied Environmental Microbiology**.v. 70, p. 6188–6196, 2004.

WHIST, A. C., OSTERAS, O. SOLVERD, L. Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective Dry-Cow Therapy and teat-dipping trial. **Journal of dairy science**. v. 89, p. 4649-4659, 2006.

WILLIAMSON, J.H., WOOLFORD, M.W., DAY, T.M. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against Streptococcus uberis. **New Zeland Veterinary Journal**. v.43, p.228–234, 1995.

WILSON, D. J.,GONZALEZ, R.N., DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal Dairy of Science**.v.80, p. 2592-2598, 1997.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-68, 1988.

WERNER E, ROE F, BUGNICOURT A, FRANKLIN MJ, HEYDORN A, MOLIN S. Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Applied Environmental Microbiology**. v. 70, p. 6188–6196, 2004.

YUAN, Y.; KERRO DEGO, O.; CHEN, X.; ABADIN, E., CHAN, S.; LAUREN, J.; KOVACEVIC, S.; ALMEIDA, R.; OLIVER, S. *Short communication*: Conservation of *Streptococcus uberis* adhesion molecule and sua gene in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse areas**. Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 7668-7637, 2014.

YANG L, HAAGENSEN JAJ, JELSBAK L, JOHANSEN HK, STERNBERG C, HØIBY N. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infection. **Journal Bacteriology,** v. 190, p. 2767–2776, 2008.

ZADOKS, R.N., ALLORE, H. G., BARKEMA, H. W., SAMPIMON, O. C., GRÖHN, Y.T. SCHUKKEN. Y.H. Analysis of an Outbreak of *Streptococcus* uberis Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 590-599, 2001.

ZAFALON, L.F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, p.577-585, 2007.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA. L. M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em Staphylococcus aureus isolados na ordenha de vacas em lactação. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 67, n. 1, p. 118-125, 2008.

ZUNIGA, E.; MELVILLE. P. A.; SAIDENBERG., A. B. S. LAES, M. A.; GONSALES., F. F.; SALABERRY, S. R. S.; GREGORI., F.; BRANDAO., P. E. B.; SANTOS., F.G.B.; LINCOPAN., N. E.; BENITES., N. R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**. v. 89, p 1-6., 2015.

XUE. T.; CHEN, X.; SHANG. F. Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 6129-6134. 2014.