



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DO SEMIÁRIDO**

GRACIELLE ALVES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA PRODUÇÃO
DE BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS EM PROPRIEDADES RURAIS**

Petrolina – PE

2017

GRACIELLE ALVES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA PRODUÇÃO
DE BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES DE
Staphylococcus aureus ISOLADOS EM PROPRIEDADES RURAIS.**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Semiárido. Linha de pesquisa: Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina – PE

2017

Santos, Gracielle Alves dos
S237c Caracterização fenotípica e molecular da produção de biofilme e resistência aos desinfetantes de *staphylococcus aureus* isolados em propriedades rurais / Gracielle Alves dos Santos. – Petrolina, 2017. 81 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa.

Referências.

1. Biofilme. 2. Resistência antimicrobiana. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 632.32

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA NO
SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

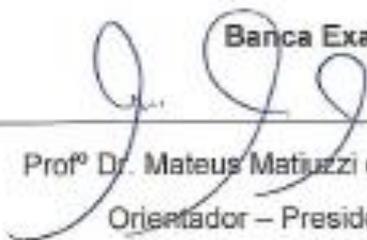
GRACIELLE ALVES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR, DA PRODUÇÃO DE
BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS DESINFETANTES DE *staphylococcus
aureus* ISOLADOS EM PROPRIEDADES RURAIS**

Trabalho apresentado como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias no
Semiárido, pela Universidade
Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: 15 de dezembro de 2017.

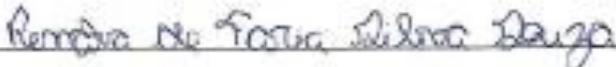
Banca Examinadora



Prof.º Dr. Mateus Matijuzi da Costa - UNIVASF
Orientador – Presidente da Banca



Prof.ª Dr.ª Gisele Veneroni Gouveia– UNIVASF
Membro Interno



Dr.ª Renata de Faria Silva Souza
Membro Externo

Dedico este trabalho a Deus, em primeiro lugar.
E a minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu bom Deus que sempre me fortaleceu nesta longa jornada. Com Quem eu me apeguei nos momentos de dificuldade. Pelas imensas bênçãos que todos os dias derrama na minha vida.

Agradeço a minha família pelo apoio, e por sempre me incentivar a buscar o meu crescimento profissional, mesmo que isso muitas vezes signifique estar ausente em momentos especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, um profissional exemplar que demonstra paixão admirável pelo ensino e que me inspira. Agradeço a paciência e compreensão e por me incentivar a sempre buscar cada vez mais o conhecimento.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, em especial a Michelline, Wilton, Samily, Naiana, Danilo, Vinícius e Bruna Crislaine que me ajudaram muito durante este trabalho.

A professora Francesca e em especial Anay, Thyalla, Jane e Anete do Laboratório de Tecnologia e Produtos de Origem Animal – Leite, que foram extremamente generosas comigo, se organizando para que eu pudesse também usar os equipamentos.

Aos meus amigos Geandre, Jeslayne e Socorro que foram tão solícitos comigo, por muitas vezes deixaram de aproveitar os seus finais de semana para me levar ao laboratório. Sou imensamente grata!

Enfim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação profissional e pessoal!

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

Albert Einstein

RESUMO

Staphylococcus spp. são importantes agentes etiológicos em infecções animais e humanas. Nos ruminantes, estão implicados principalmente com a ocorrência da mastite, causando grandes prejuízos à produção. Entre as diversas formas de controle da doença, as medidas de higiene figuram como importantes práticas, uma vez que são capazes de impedir a disseminação de muitos microrganismos no ambiente e em fômites utilizados durante a ordenha. Neste trabalho, o objetivo foi isolar bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, a partir de diferentes superfícies do ambiente de ordenha (teteiras, piso/solo e mãos do ordenhador), bem como, realizar a caracterização fenotípica e molecular dos mesmos. Para a avaliação molecular, foi pesquisada a presença de genes relacionados à produção do biofilme (*icaA* e *icaD*) e resistência aos beta-lactâmicos (*mecA* e *blaZ*). Foi avaliada a sensibilidade dos isolados a diversas classes de antibióticos. Da mesma forma, foi verificada a resistência aos desinfetantes (clorexidine 0,04%, iodo 0,7% e cloro 2,5%) através da Concentração Bactericida Mínima, além da habilidade de produção de biofilme. Foi possível observar que dos 22 isolados, 59,09% pertencem ao grupo *Staphylococcus* coagulase-negativa e 40,90% foram identificados como *Staphylococcus aureus*. Muitos dos isolados apresentaram resistência a pelo menos uma das penicilinas e o gene *blaZ* foi o mais encontrado entre os isolados avaliados. Grande parte dos isolados foi sensível a clorexidine a 0,00016%, iodo a 0,044% e ao cloro a 0,078%. Para a produção de biofilme, 90,9% dos isolados foram classificados como fracos produtores de biofilme, moderados ou fortes. Apenas dois isolados (9,1%) não produziram biofilme. Na identificação molecular, 12 isolados tiveram a confirmação da presença dos genes *icaA* e *icaD*. Portanto, foi possível concluir que os isolados presentes no ambiente de ordenha apresentam alto potencial patogênico, sendo assim, considerados uma ameaça para a produção animal e ao homem.

Palavras-chave: *Staphylococcus* ssp. Resistência antimicrobiana. Biofilme. Desinfetantes.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. are important etiologic agents in animal and human infections. In ruminants, they are mainly involved with the occurrence of the mastitis, causing great damage to production. Among the various forms of disease control, hygiene measures are important practices, since they are capable of preventing the spread of many microorganisms in the environment and in fomites used during milking. In this work, the objective was to isolate bacteria belonging to the genus *Staphylococcus*, from different surfaces of the milking environment (liners, floor /soil and hands of the milker), as well as perform the phenotypic and molecular characterization of the same. For the molecular evaluation, the presence of genes related to biofilm production (*icaA* and *icaD*) and resistance to beta-lactams (*mecA* and *blaZ*) were investigated. The sensitivity of the isolates to several classes of antibiotics was evaluated. Likewise, resistance to disinfectants (chlorhexidine 0.04%, iodine 0.7% and chlorine 2.5%) was verified through the Minimum Bactericidal Concentration and the ability to produce biofilm. It was possible to observe that of the 22 isolates, 59.09% belong to the coagulase-negative *Staphylococcus* group and 40.90% were identified as *Staphylococcus aureus*. Many of the isolates showed resistance to at least one of the penicillins and the *blaZ* gene was the most found among the isolates evaluated. Most isolates were sensitive to chlorhexidine (0.00016%), iodine (0.044%) and chlorine (0.078%). For the biofilm production, 90.9% of the isolates were classified as weak, moderate or strong biofilm producers. Only two isolates (9.1%) did not produce biofilm. In the molecular identification, 12 isolates had confirmation of the presence of *icaA* and /or *icaD* genes. Therefore, it was possible to conclude that the isolates present in the milking environment present high pathogenic potential, being thus considered a threat to animal production and to man.

Keywords: *Staphylococcus* ssp. Antimicrobial resistance. Biofilm. Disinfectants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais estruturas do úbere.	118
Figura 2 - Etapas da formação de biofilme.....	26
Figura 3 - CBM de clorexidine 0,04% sobre isolados de Staphylococcus spp.	44
Figura 4 - CBM do iodo 0,7% sobre os isolados de Staphylococcus spp.....	44
Figura 5 - CBM do cloro 2,5% sobre os isolados de Staphylococcus spp.....	45
Figura 6 - Interferência dos desinfetantes sobre o biofilme em formação de Staphylococcus spp.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos empregados nas reações de PCR.....	33
Tabela 2 - Parâmetros da PCR para os genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>cap5</i> e <i>cap8</i>	34
Tabela 3 - Locais da colheita e amostras conforme o tipo de ordenha.	38
Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	39
Tabela 5 - Presença dos genes <i>mecA</i> e <i>blaZ</i> nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	40
Tabela 6 - Perfil de produção de biofilme pelos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	41
Tabela 7 - Presença dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. ...	42
Tabela 8 - Presença dos genes <i>cap5</i> e <i>cap8</i> nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. ...	43
Tabela 9 - Interferência dos desinfetantes sobre o biofilme em formação dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	46
Tabela 10 - Relação da formação do biofilme fenotípico dos isolados em diferentes temperaturas	44
Tabela 11 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença da clorexidine em diferentes temperaturas	45
Tabela 12 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença do cloro em diferentes temperaturas.	46
Tabela 13 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença do iodo em diferentes temperaturas	47

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 . PANORAMA ATUAL DA BOVINOCULTURA.....	16
2.2. GLÂNDULA MAMÁRIA.....	17
2.3. MASTITE.....	18
2.3.1. Aspectos etiológicos.....	20
2.4. <i>Staphylococcus</i> spp.	22
2.4.1. Aspectos microbiológicos e bioquímicos.....	22
2.4.2. Fatores de virulência.....	23
2.5 . BIOFILME	24
2.6. CONTROLE DA MASTITE.....	27
3.OBJETIVOS.....	29
3.1. OBJETIVO GERAL	29
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	29
4.MATERIAIS E METÓDOS.....	30
4.1.APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	30
4.2.ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	30
4.3.ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i> spp.	30
4.4.TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	31
4.5. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA.....	32
4.5.1. Extração de DNA genômico.....	32
4.5.2. Reação em cadeia da polimerase.....	32
4.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	35
4.7. PRODUÇÃO DO BIOFILME.....	36
4.8. INTERFERÊNCIA DOS DESINFETANTES NA FORMAÇÃO DO BIOFILME	36

4.9. PRODUÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA....	37
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	38
5.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
5.3. SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp.	39
5.4. PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp.	40
5.5. PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp. PARA OS GENES PRODUTORES DE CÁPSULA	42
5.6. CBM DOS DESINFETANTES SOBRE OS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp.	43
5.7. INTERFERÊNCIA DOS DESINFETANTES SOBRE O BIOFILME EM FORMAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp.	46
5.8. INTERFERÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS DE <i>Staphylococcus</i> spp E AÇÃO DOS DESINFETANTES.	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil tem apresentado bons índices econômicos, no entanto, a mesma ainda enfrenta alguns entraves, principalmente relacionados à qualidade do leite produzido (ACOSTA et al., 2016). Esse fator é essencial para o desenvolvimento da indústria de laticínios no país, e problemas relacionados com a sanidade do rebanho influenciam negativamente esse setor (CASANOVA et al., 2016). Neste contexto, a mastite ganha destaque por ser uma enfermidade que afeta rebanhos leiteiros no mundo causando significativas perdas econômicas (AZEVEDO et al., 2016). Essa doença é caracterizada por uma inflamação da glândula mamária causada principalmente por agentes bacterianos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, assim como por coliformes (VANDERHAEGHEN et al., 2014).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são os agentes etiológicos mais importantes nas mastites bovinas, em especial *Staphylococcus aureus*, uma vez que é reconhecido com importante patógeno causador de quadros agudos e crônicos. A cronicidade dessa doença está ligada a vários fatores de virulência, entre os quais: formação de biofilme, sobrevivência intracelular, expressão de cápsula e grupo *agr* (BARDIAU et al., 2016). O biofilme confere proteção contra as defesas do sistema imune do hospedeiro, assim como da ação dos antibióticos (BOZIC et al., 2014).

Apesar da antibioticoterapia ser amplamente adotada para o controle da mastite, seu uso excessivo e/ ou incorreto tem representado um sério risco devido à emergência de bactérias resistentes (WHITE AND MCDERMOTT, 2001). Essa condição é mais agravada em função da presença de bactérias com perfis de resistência a múltiplos antibióticos. Adicionalmente, esses microrganismos são capazes de produzir toxinas termoestáveis, fato que representa um risco à saúde pública em função do potencial de intoxicação alimentar (ASLANTA et al., 2016; AVANCINI, BOTH 2017).

A disseminação dessas bactérias nos rebanhos está principalmente relacionada à falta de cuidados com a higiene no ambiente de ordenha, desde a ausência das práticas de *pré-dipping* e *pós-dipping*, até aos cuidados na higienização do maquinário da ordenha e das mãos do ordenhador (AMARAL et al., 2004).

Diante dos riscos que a mastite, causada por bactérias do gênero *Staphylococcus*, promove na cadeia produtiva de leite, e por representar um problema de saúde pública, torna-se importante detectar a presença desses microrganismos em rebanhos e ambientes de ordenha, determinar seus fatores de virulência, assim como observar o potencial de resistência a práticas sanitárias que possam ser adotadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.PANORAMA ATUAL DA BOVINOCULTURA

O leite é um importante produto de consumo mundial e variações na cadeia de produção têm sido observadas no Brasil, principalmente concernentes à busca por melhorias no processo de produção, a exemplo do emprego de novas tecnologias (EMBRAPA, 2011). É possível notar que essas melhorias estão em concordância com uma demanda mundial por produtos de alta qualidade, vinculados a um menor impacto ambiental e bem-estar animal (MACHADO; MACHADO FILHO, 2014).

O perfil de consumo de produtos lácteos exibe uma grande variação em cada região e, entre locais de uma mesma região. Essas variações podem ser justificadas pelo tipo de produto oferecido, assim como, pela dieta e cultura daquele país. Atualmente, o consumo de leite e produtos lácteos *per capita* tem sido maior nos países desenvolvidos. Porém, essa diferença tem sido reduzida, em função do aumento dos rendimentos nos países em desenvolvimento. A crescente demanda por leite e produtos lácteos fornece aos produtores e demais envolvidos na cadeia de laticínios, a oportunidade de mostrar o seu alto potencial, com o aumento da produção através da integração de todos os elos da cadeia produtiva (FAO, 2014). Espera-se que o crescimento da produção mundial de leite diminua ligeiramente na próxima década, passando de 2,0% ao ano (p.a.) para 1,8% p.a. Entretanto, mesmo com taxas de crescimento menores, haverá um aumento de 23% na produção total de leite na próxima década. A maior parte desse suprimento adicional (73%) virá dos países em desenvolvimento, como resultado do aumento de rendimento por vaca (1,4% p.a.), impulsionado pelo aumento do rebanho leiteiro (1,2% p.a.) e pelos menores preços dos alimentos. Essa é uma notável mudança comparada a última década, quando a produção cresceu principalmente baseada na expansão dos rebanhos leiteiros (2,4% p.a.), enquanto, o rendimento aumentou apenas 0,5% p.a. Apesar das previsões de melhoria dos rendimentos, os ganhos de muitos países em desenvolvimento serão baixos e o crescimento absoluto da produtividade permanecerá pequeno (FAO, 2016).

Os países que atualmente estão no *ranking* de maiores produtores mundiais de leite e com perspectiva de continuar até 2025 são: os países da União Européia, Índia, Estados Unidos, China, Paquistão, Rússia e Brasil. Esses países apresentaram produção acima dos 25 milhões de litros de leite entre 2013-2015 (FAO, 2016). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - USDA*), o Brasil foi o sexto maior produtor mundial de leite em 2015, atrás de União Europeia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia (USDA, 2016).

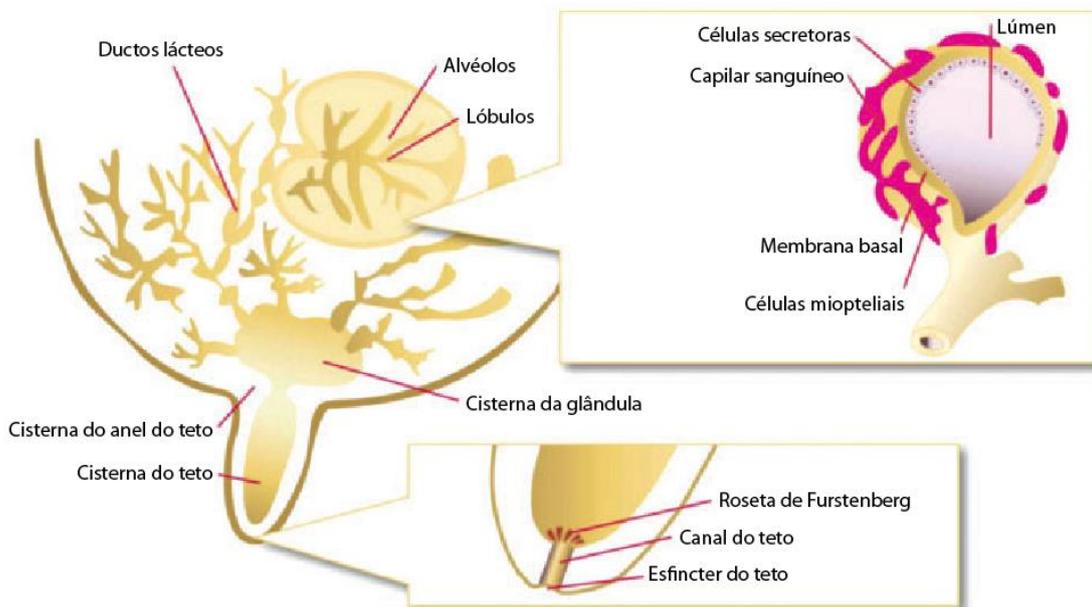
A pecuária leiteira no país registrou aumento dos custos de produção, bem como, uma redução do número de vacas ordenhadas e produção de leite. Também houve queda do preço do leite pago ao produtor, além de contração na aquisição do produto pelas indústrias e das exportações de produtos lácteos. Adicionalmente, a diferença entre o total de leite produzido no Brasil, e a quantidade de leite cru adquirido pelos laticínios, sob vigilância sanitária, reflete uma produção nacional não fiscalizada. Em 2015, o setor sofreu retrações e a produção de leite fiscalizada representou 68,7% do total produzido no país. Com relação à produção por região, desde 2014 a região Sul tem-se firmado como a maior produtora de leite, com o Sudeste em segunda posição seguido pelo Centro-Oeste, Nordeste e Norte (IBGE, 2015).

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

2.2 GLÂNDULA MAMÁRIA

Nos ruminantes, a glândula mamária (Figura 1) recebe o nome de úbere, o qual constitui a estrutura morfológica responsável pela produção do leite. A glândula mamária é formada de dois tecidos diferentes: o parênquima e o estroma. O parênquima glandular é constituído por células epiteliais secretoras. Essas células, por sua vez, formam os alvéolos mamários que são responsáveis pela síntese do leite. O estroma glandular corresponde a um tecido intersticial que possui capilares sanguíneos, células mioepiteliais e fibras reticulares (KLEIN, 2014).

Figura 1 - Principais estruturas do úbere.



Fonte: <http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/uso-de-oxitocina-em-vacas-leiteiras>

É dentro dos alvéolos que se inicia a síntese do leite, e esse é secretado pelas células do epitélio mamário que captam do sangue os nutrientes necessários para a produção do leite, como as moléculas de glicose para formar a lactose. O leite produzido é ejetado por ação das células mioepiteliais que recobrem o alvéolo. Essas células contraem e fazem com que as células epiteliais liberem o leite para o lúmen do alvéolo. O leite é drenado dos alvéolos por um sistema de vários ductos até que chegue à cisterna da glândula mamária. Quando ocorre o estímulo para a liberação, através da ação do hormônio ocitocina, o leite é liberado da cisterna através do teto da glândula (DUKES, 2006). A conformação do teto dificulta a infecção por bactérias invasoras, portanto, alterações nessa estrutura influenciam os mecanismos de defesa e aumentam a susceptibilidade da glândula a infecções causadas por microrganismos, principalmente os envolvidos na mastite (CARNEIRO et al., 2009).

2.3.MASTITE

Dentre as doenças que afetam o gado leiteiro, pode-se considerar a mastite a de maior prevalência. Essa doença causa prejuízo ao produtor, uma vez que há

redução na produção de leite, assim como, seu descarte, abate dos animais antes do tempo, além de custos com serviços veterinários e medicamentos (GOMES; HENRIQUES, 2016). O desenvolvimento da mastite vai depender da interação entre diversos fatores associados ao hospedeiro (estágio da lactação, idade e genética do animal), patógenos específicos, ao meio ambiente e ao sistema de manejo (ZHANG et al., 2016).

A mastite é uma patologia caracterizada por uma inflamação da glândula mamária principalmente de origem infecciosa, capaz de causar alterações físico-químicas no leite (RIBEIRO et al., 2009). A patogênese da doença envolve três estágios: invasão, multiplicação e inflamação. A invasão é o estágio no qual os patógenos invadem o canal do úbere. O segundo estágio é caracterizado pela multiplicação dos microrganismos e sua disseminação no epitélio mamário. A multiplicação desses agentes patogênicos pode resultar na liberação de endotoxinas com possíveis efeitos sistêmicos. Por fim, após evasão do sistema imune e inflamação estabelecida, nos casos de mastite clínica, é possível observar alterações no úbere com aumento de tamanho, elevação da temperatura e em casos graves de gangrena, abscessos e perda da funcionalidade. Assim como, alterações na composição do leite e presença de produtos resultantes da inflamação, flocos e coágulos (RODOSTITIS et al., 2010)

As mudanças na qualidade do leite são caracterizadas também pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) (MALEK DOS REIS et al., 2013). A CCS é um importante teste utilizado para detectar a infecção intramamária, constituindo um método de diagnóstico da mastite, pois essa patogenia causa um aumento considerável no número de células somáticas. Para atestar a qualidade do leite é imprescindível que além de se realizar a CCS, se faça também uma análise microbiológica do leite para identificar qual agente etiológico está causando a mastite. A lactocultura é considerada uma importante medida padrão para definir a qualidade do leite cru. O teste pode ser realizado através dos métodos diretos de contagem celular, pelo exame eletrônico em aparelhos ou indiretos, usando o *California Mastite Test* (CMT) (LANGONI et al., 2011; SOUZA et al., 2016).

A mastite pode apresentar duas formas, a clínica e a subclínica. Na primeira, os sinais da infecção são perceptíveis, enquanto, a segunda é de difícil detecção, sendo necessário exames complementares (LANGONI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009). A mastite clínica é caracterizada principalmente pela queda na produção do

leite e alterações como o aumento das células somáticas. Também é facilmente detectada no exame físico da glândula, uma vez que é possível observar os sinais da inflamação (inchaço, vermelhidão e dor no úbere). Da mesma forma, apresenta sinais sistêmicos como apatia, febre e choque. Geralmente essa inflamação é causada por algum agente infeccioso, em sua maioria por bactérias (CASANOVA et al., 2016 THOMPSON-CRISPI et al., 2014).

Dentre as bactérias que causam mastite clínica, *Staphylococcus aureus* apresentam alta incidência. Esses microrganismos, ao infectarem a glândula mamária, vão aderir ao epitélio e iniciar a sua multiplicação, causando uma inflamação que resulta em alterações na aparência e consistência do úbere (MORITZ et al., 2017). A queda na produção, geralmente, está relacionada com alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade vascular dos alvéolos. A gravidade da perda da função depende da infecção, do tipo de microrganismo, da duração da infecção, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético (CUNHA, 2008). Segundo Oliveira et al. (2015), a incidência dessa enfermidade nos rebanhos está relacionada com alguns fatores de risco ligados ao rebanho (falta de manejo adequado dos animais doentes), as vacas (CCS, paridade, estágio da lactação e histórico de mastite) e ao teto (posição do teto, a distância do teto do chão e colonização bacteriana).

Na mastite subclínica, em função dos sinais serem mais discretos, se faz necessário a execução de testes com uma maior acurácia. O *CMT* é um importante teste de triagem, mas é através da contagem de células somáticas que é possível afirmar a condição subclínica (SADEK et al., 2017). Além disso, é importante detectar o microrganismo responsável pela infecção, a fim de definir o melhor tratamento (ACOSTA et al., 2016). Os microrganismos responsáveis pela maior parte dos casos de mastite subclínica são *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN). Essas bactérias aumentam a CCS e causam uma infecção de leve a moderada, porém, podendo afetar o úbere com mais severidade (CONDAS et al., 2017).

2.3.1 Agentes etiológicos

A mastite contagiosa é causada, em sua maioria, por microrganismos que têm como reservatório a glândula mamária, como *S. aureus*. Além de várias espécies de

SCN, assim como, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp. Esses microrganismos são transmitidos horizontalmente, ou seja, de um animal infectado para os seus contactantes. A contaminação ocorre geralmente no momento da ordenha, através das mãos do ordenhador, equipamentos da ordenha ou outros fômites de uso comum (LANGONI et al., 2015)

Entre os microrganismos capazes de causar a mastite contagiosa, os que apresentam maior potencial patogênico são as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., principalmente *S. aureus*. Essa bactéria tem predileção por quartos mamários infectados, pele do úbere e tetos, os quais servem como reservatório para o agente. Um dos problemas causados por *S. aureus* nas infecções intramamárias é concernente à produção de toxinas que contribuem para a patogênese da infecção. Logo, esse microrganismo representa um risco para a saúde pública, devido ao fato que o leite mesmo pasteurizado, pode apresentar contaminação por enterotoxinas termoestáveis, causando distúrbios alimentares no consumidor (SAEKI et al., 2011).

S. aureus é o microrganismo presente na maioria dos casos de mastite, causando grandes perdas em fazendas leiteiras, além de ser uma bactéria resistente a vários antimicrobianos, que são frequentemente utilizados para o tratamento da doença. Apesar de um relativo conhecimento sobre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, ainda não se tem bem elucidado os aspectos relacionados com o desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana (BEURON et al., 2014).

Outros importantes representantes do gênero *Staphylococcus* são os microrganismos do grupo SCN. Eles têm sido frequentemente detectados em amostras de animais com mastite. Devido a sua heterogenicidade, as bactérias desse grupo tornam o controle e tratamento da mastite de difícil execução (ACOSTA et al., 2016).

A mastite ambiental é causada por agentes que se encontram normalmente no ambiente, principalmente nos locais onde os animais são mantidos, como salas de ordenha, currais, entre outros. Os principais representantes da enfermidade são: *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. Existem, porém, outros agentes menos frequentes como: *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., fungos e vírus (AMORIM et al., 2010; SAEKI et al., 2011; LANGONI et al., 2015).

As infecções intramamárias (IM) por *S. uberis* e *E. coli* têm aumentado principalmente nos rebanhos leiteiros com rigoroso controle sanitário e com baixa CCS. A ocorrência da mastite por *S. uberis* pode acontecer em qualquer momento da vida da vaca, afetando as novilhas grávidas, primíparas e múltiparas. Nas vacas em lactação e de transição, essa bactéria pode se instalar no úbere causando uma mastite crônica. As informações sobre *S. uberis* ainda são escassas, mas sabe-se que essa bactéria é capaz de resistir à ação fagocitária, devido a sua capacidade de expressar uma cápsula de ácido hialurônico (PRADO et al., 2011).

2.4 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* tem sido amplamente discutido como um importante agente causador de problemas em saúde pública, devido a sua capacidade de causar infecções tanto em animais como em seres humanos. Nesses, podem ocorrer casos de intoxicação alimentar pela ingestão de enterotoxinas produzidas por essas bactérias, as quais podem causar a síndrome do choque tóxico. Adicionalmente, desempenham um papel na patogenicidade de lesões cutâneas em recém-nascidos. Nos animais, são frequentemente isolados de mastite bovina, e em sua maioria, as cepas são produtoras de enterotoxinas, o que representa um risco para o homem (CHAPAVAL et al., 2008).

2.4.1 Aspectos microbiológicos e bioquímicos

Alguns estafilococos podem apresentar atividade coagulase-positiva, principalmente *S. aureus*. Embora, as bactérias do grupo SCN possuam menor importância, em mastites clínica e subclínica estão se tornando patógenos dominantes. De acordo com Waller et al. (2011), a prevalência das infecções por SCN podem variar entre regiões e países. Na maioria dos casos, esses microrganismos são mais comumente implicados nas mastites clínicas. Este grupo de bactérias apresenta uma variedade de espécies, sendo que cerca de 15 já foram identificadas e associadas com a mastite. Para a caracterização desse grupo a nível de espécie, como *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus xylosum*, a genotipagem é mais confiável que a identificação por fenótipo (WALLER et al., 2011). A

diferenciação de *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) e SCN é feita através de um teste bioquímico, no qual se verifica a habilidade da bactéria produzir uma enzima coagulase extracelular, capaz de coagular o plasma sanguíneo animal por conversão de fibrinogênio em fibrina (SANTOS et al., 2016).

Dentre do grupo de microrganismos SCP, *S. aureus* tem sido constantemente detectado nos casos de mastites contagiosas e doenças em humanos. Essa bactéria apresenta-se como um patógeno oportunista em humanos, causando uma gama de doenças, desde infecções superficiais até síndrome do choque tóxico e septicemia. *S. aureus* apresenta uma diversidade de fatores de virulência, que lhe confere a capacidade de colonizar e causar doenças em hospedeiros mamíferos (BAPTISTA et al., 2015).

2.4.2 Fatores de virulência

Em animais, *S. aureus* está associado à mastite bovina contagiosa, podendo causar infecções de graus variados. A mastite subclínica é mais onerosa para os produtores devido à queda na produção e qualidade do leite. Por outro lado, algumas características inerentes às bactérias estão relacionadas com a ocorrência de infecções crônicas, entre as quais: formação de biofilme, sobrevivência intracelular, produção de cápsula e o grupo *agr*. As bactérias que possuem o gene *agr* apresentam características que as auxiliam na persistência no úbere. Esses microrganismos são mais propícios de serem internalizados e apresentam associação com a resistência a penicilina. Esse processo de internalização garante as bactérias proteção contra a ação dos fármacos comumente utilizados no tratamento da mastite, principalmente β -lactâmicos (BARDIAU et al., 2016)

Outro importante fator de virulência em *S. aureus* é a cápsula ou polissacarídeo capsular (PC), um componente bacteriano da parede celular que protege as bactérias da ação fagocitária (MARQUES et al., 2013). Embora tenham sido identificados, em isolados de *S. aureus*, onze sorotipos de polissacarídeos capsulares, apenas os sorotipos 1, 2, 5 e 8 foram purificados e caracterizados quimicamente. Entre eles, os tipos 5 e 8 são prevalentes em *S. aureus* isolados de infecções humanas e bovinas (SALIMENA et al., 2016). A maioria das cepas de *S. aureus* isolados de vacas com mastite é encapsulada o que reflete a importância desta característica nas mastites bovinas, a maioria das cepas de leite bovino são

classificadas com tipo 5 e 8, sendo sua síntese codificada pelos genes *cap5* e *cap8* respectivamente (CABRAL et al., 2004).

Com relação à resistência aos antibióticos, algumas estirpes de *S. aureus*, como as resistentes a meticilina (MRSA, do inglês *Multiple-resistant Staphylococcus aureus*), são vistas como um perigo à saúde humana e animal, uma vez que dificultam os tratamentos (ARTUSSON et al., 2016). A resistência aos antibióticos está relacionada ao uso indiscriminado para o tratamento e prevenção da mastite em rebanhos bovinos, o que causa a seleção de patógenos resistentes aos antibióticos. Os antibióticos da classe beta-lactâmicos foram usados por anos para tratar infecções intramamárias em vacas com mastite, fato que culminou com a queda da eficiência desses fármacos. Esse quadro de resistência pode ser devido à presença da β -lactamase, uma enzima codificada pelo gene *blaZ* ou pela proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade (PBP2a, do inglês *penicillin binding protein*), considerada um mecanismo de resistência β -lactâmico chamado resistência meticilina/oxacilina, a qual é codificada pelo gene *mecA* (ASLANTAS; DEMIR, 2016).

De acordo com Doulgeraki et al. (2016), a epidemiologia dessas cepas altamente virulentas tem variado muito, com o surgimento de novas evidências que sugerem que os animais de produção atuam como reservatórios de MRSA. Adicionalmente, a detecção de cepas MRSA em alimentos evidencia uma provável disseminação dessas bactérias através da cadeia de produção de alimentos. MRSA tem a capacidade de formar biofilme, um importante fator de virulência que permite as bactérias se fixarem em superfícies (DOULGERAKI et al., 2016).

A capacidade de *S. aureus* formar biofilme é considerada um importante determinante de virulência, que contribui para sua patogênese na mastite, protegendo a bactéria das defesas do organismo e ação de antibióticos (DHANAWADE et al., 2010; GOETZ et al., 2017).

2.5. BIOFILME

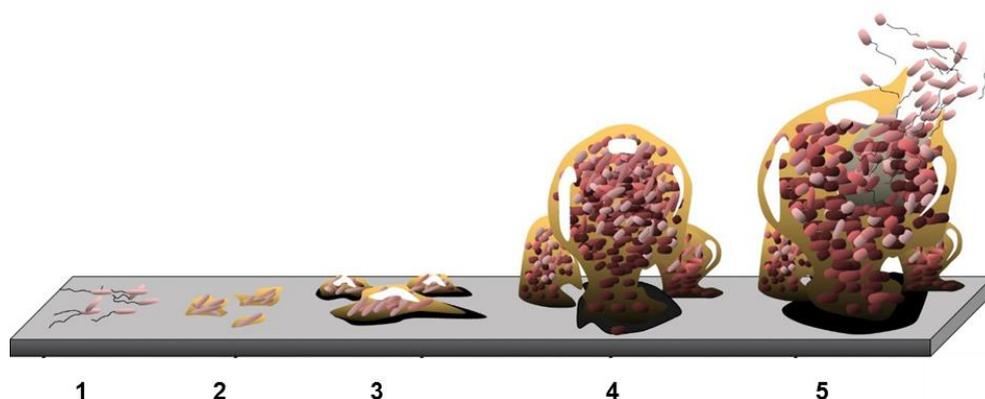
O biofilme é uma matriz constituída por microrganismos, substâncias poliméricas extracelulares (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), partículas retidas e substâncias dissolvidas e absorvidas. A funcionalidade do biofilme, assim como suas características morfológicas e estruturais são dependentes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

biofilme pode ser encontrado no ambiente natural na forma heterogênea, sendo composto por mais de um microrganismo da mesma espécie, gênero, assim como, podem apresentar uma gama de microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e fungos. Em boas condições de pH, temperatura e fatores nutricionais são capazes de produzir uma matriz polissacarídica resistente (CHAGAS et al., 2015).

Essa matriz pode aderir a uma superfície abiótica ou biótica, possibilitando que a bactéria cresça protegida, permitindo assim, a sua sobrevivência em um ambiente hostil. Os biofilmes constituem uma importante barreira contra as defesas do sistema imune do hospedeiro, e também são resistentes à ação de antibióticos, proporcionando infecções bacterianas crônicas, como a mastite bovina (SALIMENA et al., 2016).

Basicamente, o biofilme segue uma sequência bem organizada de formação (Figura 2), que não varia muito entre as espécies bacterianas, sendo constituído por três fases: 1) aderência ou fixação, 2) acumulação/maturação e 3) separação/dispersão. Durante a fase de ligação, as células planctônicas aderem às superfícies bióticas ou abióticas e proliferam em agregados adesivos chamados de microcolônias, também conhecidas como torres ou estruturas semelhantes a cogumelos. A medida que essas microcolônias se desenvolvem, as células bacterianas produzem uma matriz extracelular (ECM, do inglês *Extracellular matrix*) que serve como um suporte essencial para estabelecer a arquitetura tridimensional. Ao atingir uma densidade celular específica, é desencadeado um mecanismo de degradação da ECM, o qual libera células para dispersar e reiniciar o desenvolvimento do biofilme em locais diferentes (MOORMEIER; BAYLER, 2017).

Figura 2 - Etapas da formação de biofilme. 1. Células plactônicas livres; 2. Adesão das células ao substrato; 3. Produção da matriz polimérica; 4. Maturação e 5. Dispersão.



Fonte: O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

De acordo com Bozic et al. (2014), a PIA atua como uma espécie de cola, tornando a camada mais aderente e mais resistente aos antimicrobianos e agentes ambientais. A PIA, também conhecida como poli-N-acetil-b-(1,6)-glucosamina (PNAG), é codificada pelos genes do operon *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *IcaD*) (SCHORNBORN E KROMER, 2016). O gene *icaA* é responsável por codificar a N-acetilglucosaminiltransferase, enzima que participa da produção de oligômeros de N-acetilglucosamina da UDP-N-acetilglucosamina. Enquanto, *IcaD* desempenha um papel crítico na expressão máxima de N-acetilglucosaminiltransferase, levando à produção do polissacarídeo capsular. Há ainda a presença de uma outra proteína que é conhecida como BAP, a qual está envolvida na formação do biofilme por *S. aureus*. Esta proteína, codificada pelo gene *bap*, está implicada na formação de biofilme através da fixação primária e adesão a superfícies. Isolados que apresentam o gene *bap* são capazes de produzir forte biofilme mesmo na ausência do operon *icaABCD* (ASLANTAS; DEMIR, 2016; SALIMENA et al., 2016).

A correlação entre a formação de biofilme e persistência bacteriana tornou necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, que combinem a antibioticoterapia atual com drogas voltadas para a inibição da formação dessa estrutura.

2.6 CONTROLE DA MASTITE

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

É importante salientar que no momento da ordenha, os tetos estejam limpos e que o *pré-dipping* tenha sido realizado, a fim de evitar contaminações por *S. aureus*, uma vez que, essa bactéria pode ser encontrada em vacas com precária higiene do úbere (AZEVEDO et al., 2016). O processo de antissepsia dos tetos através do *pré-dipping* e *pós-dipping* é uma prática amplamente recomendada no controle da mastite, por reduzir o número de bactérias na pele do teto e curar lesões de teto pré-existentes. Para patógenos contagiosos como *S. aureus*, a antissepsia dos tetos após a ordenha permanece como uma prática simples, efetiva e economicamente viável na prevenção de novas infecções intramamárias (SANTOS et al., 2016).

Segundo Silva et al. (2015), a imersão dos tetos em soluções antissépticas adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para a redução da mastite contagiosa, podendo reduzir os casos de mastite subclínica em até 85%. Os princípios ativos mais utilizados para antissepsia dos tetos são iodo, clorexidine, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Com objetivo de minimizar a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses germicidas, como glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (SILVA et al., 2015). Várias opções de desinfetantes comerciais para o *pré-dipping* e *pós-dipping* estão disponíveis, mas é importante conhecer as concentrações ideais de cada um e o tempo de exposição, para evitar a presença de resíduos no leite e agressão da pele do teto. O iodo tem ação bactericida sobre as bactérias por causar alterações no ácido nucléico e na síntese protéica (RODRIGUES et al., 1997). Soluções de iodo devem ser utilizadas em baixas concentrações (0,5% ou menos), uma vez que concentrações a 1% podem deixar resíduos no leite. A clorexidine quando comparada ao iodo, apresenta uma menor reação tecidual nas diluições recomendadas, o que torna seu uso comum para o tratamento de infecções

superficiais dos tetos, além de apresentar efeito por longo período (MEDEIROS et al., 2009). A clorexidine, de acordo com Azizoglo et al. (2013), pode ser um poderoso desinfetante quando se considera uma patógeno específico, sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentrações abaixo de 0,0002%. A clorexidine atua nas bactérias agredindo suas membranas citoplasmáticas, ocasionando o extravasamento do ácido nucleico e potássio, porém não apresenta eficácia contra os esporos, mas caso seja submetida a altas temperaturas pode apresentar efetividade (BAMBACE et al, 2008). .

O hipoclorito de sódio (NaCl) é um agente muito utilizado na higienização das salas de ordenha, principalmente para a higienização das teteiras na formulação de 2,5%. .Porém, seu uso no *pré-dipping* e *pós-dipping* não é muito indicado, por possuir uma ação agressiva sobre a pele do teto. Como agente sanitizante na higiene da sala de ordenha, deve ser utilizado após uma limpeza prévia, uma vez que na presença de matéria orgânica tem sua ação antimicrobiana diminuída (COUTINHO et al., 2012). O hipoclorito de sódio vai atuar sobre as proteínas essenciais das bactérias causando agregação, isto faz com que a estrutura dessas bactérias seja alterada de forma irreversível (WINTER et al., 2008).

Diante desse cenário, tem ganhado importância a pesquisa sobre a ação de desinfetantes, comumente utilizados, sobre a formação de biofilme por bactérias que causam mastite, principalmente as representantes do gênero *Staphylococcus* spp.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de diferentes superfícies de instalações de propriedades rurais no interior dos estados de Pernambuco e Bahia, quanto ao perfil de virulência e resistência aos desinfetantes mais amplamente empregados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar *Staphylococcus* spp. de amostras obtidas em propriedades rurais no interior dos estados da Bahia e Pernambuco;
- Determinar o perfil fenotípico de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. a drogas antimicrobianas;
- Verificar a presença dos genes que codificam para a produção de biofilme (*icaA* e *icaD*), resistência a drogas antimicrobianas (*mecA* e *blaZ*) e produção de antígenos capsulares (*cap5* e *cap8*) nos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Verificar a Concentração Bactericida Mínima dos desinfetantes clorexidine, iodo e cloro sobre os isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Avaliar a produção de biofilme dos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Verificar a interferência dos desinfetantes clorexidine, iodo e cloro sobre o biofilme em formação dos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Analisar a influência da temperatura sobre a produção de biofilme dos isolados de *Staphylococcus* spp. e sobre a capacidade dos desinfetantes clorexidine, iodo e cloro interferirem com o biofilme em formação desses isolados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas (CEDEP) da UNIVASF com o número do parecer 1.794.433 (Anexo I).

4.2 ORIGEM DAS AMOSTRAS

As amostras foram colhidas em ambientes de ordenha de propriedades leiteiras em Senhor do Bonfim/BA (latitude 10° 27' 46" sul e longitude 40° 11' 27" oeste, a 600 metros de altitude) e Afrânio/PE ("latitude 08° 30' 54" sul e longitude 41° 00' 18" oeste, a uma altitude de 522 metros). Em cada cidade, foram realizadas colheitas em seis fazendas que adotam a ordenha manual ou mecânica. Para fazendas com ordenha manual foram obtidas amostras de solo e mão do ordenhador, enquanto, em locais com ordenha mecânica foram colhidas amostras de piso, teteira e mão do manipulador.

Para a coleta nas teteiras, *swabs* estéreis foram passados por toda extensão do equipamento que fica em contato com o teto do animal. Nas mãos dos manipuladores/ ordenhadores foi utilizado um *swab* estéril umedecido com soro fisiológico estéril, friccionando três vezes entre os dedos e na palma da mão. Enquanto, as amostras das superfícies das instalações (solo ou piso) foram obtidas também com o auxílio de *swab* estéril (AMARAL et al., 2004; YAMAMURA et al., 2007; IUNG et al., 2013). Os *swabs* foram transferidos para tubos contendo 2 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - Kasvi) e as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas em contato com gelo. Em seguida, foram encaminhadas para análise no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* spp.

O isolamento de *Staphylococcus* spp. foi realizado a partir de 1 mL de cada amostra. Foram efetuadas diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³ em água peptonada a

0,1 %. A semeadura, em ágar *Baird-Parker* (Kasvi), foi efetuada com 0,1 mL da diluição 10^{-3} com auxílio de uma alça de Drigalski, com posterior incubação em estufa (Novatécnica) a 37°C por 48 h, de acordo com Silva et al. (2007).

Após o crescimento bacteriano, foi realizada uma triagem de colônias que apresentassem coloração negra, brilhante e rodeadas com halo claro de 2 a 5 mm de largura, tais aspectos característicos de *Staphylococcus* spp. Foram selecionadas duas a três colônias para serem cultivadas em meio *Trypticase Soy Agar* (TSA - Kasvi) com incubação a 37°C por 24 h, e posterior realização da coloração de Gram. Os isolados identificados como cocos gram-positivos foram submetidos às provas bioquímicas catalase, oxidase, *Purple Agar Base* (PAB - HiMedia), coagulase (lâmina e tubo), DNase e presença de hemólise em ágar sangue ovino a 8% (GOODFELLOW et al., 2012).

4.4 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar MO2- A12 (CLSI, 2015). Previamente, eles foram inoculados em meio TSA e transferidos para tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina a 0,85%, a fim de se obter a turvação 0,5 na escala de *McFarland* ($\sim 1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias – UFC/mL). Em seguida, foram semeados em placas de ágar *Müller-Hinton* (MH, Kasvi) com auxílio de um *swab* estéril. Após a inoculação dos isolados, procedeu-se com a disposição dos discos nas placas. Os antibióticos utilizados foram: família das penicilinas com ampicilina (10 UG, Dme), amoxicilina (30 UG, Laborclin), oxacilina (1 µg, Laborclin) e penicilinaG (10 UG, Laborclin). Aminoglicosídeos: estreptomicina (10 µg, Newprov). Fluorquinolonas: enrofloxacina (5 µg, Laborclin) e norfloxacina (10 µg, Laborclin). Macrolídeos: azitromicina (15 UG, Dme). Quinolonas: ácido nalídixico (30 µg, Laborclin). Tetraciclina: tetraciclina (30 µg, Laborclin). Cefalosporinas: cefalotina (30 µg, Dme). Por fim, foram incubados em estufa a 37°C por 24 h. Os resultados foram determinados pelo diâmetro em mm dos halos.

4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.5.1 Extração de DNA genômico

Para a caracterização molecular, os isolados foram submetidos à extração do DNA genômico através da metodologia adaptada de Ausubel et al. (1989) e Wade et al. (2005). Para isso, as bactérias foram cultivadas em ágar TSA por 24 h a 37°C. Com auxílio de uma alça calibrada de 10 µL, as colônias foram adicionadas a um microtubo estéril contendo 300 µL de TE (Tris/HCl-EDTA pH 8,0). As suspensões foram homogeneizadas em vortex (Biomixer) por 2 minutos, com posterior incubação em banho seco (VHD) durante 10 min a 80°C, para inativação das amostras por calor. Adicionou-se 70 µL de SDS 10% e novamente as amostras foram homogeneizadas em vortex. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 80 µL CTAB/NaCl (Cromoline) com agitação por 2 minutos. As amostras foram novamente mantidas em banho seco com temperatura de 65°C por 10 min. Nessa etapa, foram adicionados 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1 (Synth) e as amostras foram homogeneizadas por inversão, para posterior centrifugação a 11.750 x g por 5 min. Em seguida, transferiu-se a primeira fase para outro microtubo estéril e acrescentou-se 450 µL de isopropanol, homogeneizando suavemente. As amostras permaneceram em gelo por 20 min, em seguida passaram por centrifugação a 11.750 x g por 15 min, desprezando-se o sobrenadante. Foram adicionados 500 µL de etanol 70% (Neon), com posterior homogeneização e centrifugação a 11.750 x g por 10 min. Após desprezar o sobrenadante, transferiu-se para o banho seco a 37°C. Após a secagem, foram adicionados 80 µL de TE para eluição do DNA e em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

4.5.2 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi realizada para confirmar a presença dos genes relacionados com a produção de biofilme (*icaA* e *icaD*), resistência a antibióticos beta-lactâmicos (*mecA* e *blaZ*) e cápsula (*cap5* e *cap8*). As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na tabela 1 e as condições das reações na tabela 2 (o gene *mecA* apresenta dois ciclos). O termociclador TX96 (Amplitherm) foi utilizado para a realização da PCR e os produtos da amplificação foram resolvidos

eletroforeticamente em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizados em transiluminador (Loccus).

Tabela 1- Oligonucleotídeos empregados nas reações de PCR.

Genes	Sequência 5' 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>icaA</i>	F-CCTAACTAACGAAAGGTAG R-AAGATATAGCGATAAGTGG	1315 pb	Vasudevan et al. (2003)
<i>icaD</i>	F- GCGATTGATGATGGTGATACGGTT R-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	230 pb	Vasudevan et al. (2003)
<i>mecA</i>	F- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533 pb	Swant et al. (2009)
<i>blaZ</i>	F-AAGAGATTTGCCTATGCTTC R-GCTTGACCACTTTTATCAGC	517 pb	Swant et al. (2009)
<i>cap5</i>	F- CGAACCGATGATTGATGCTATTG R- TGCTATGACTGCACCAAGTATTT	555 pb	Acosta et al. (no prelo)
<i>cap8</i>	F- GGAGGAAATGACGATGAGGATG R- TAGCTTCTGTAGCGGTGAATG	608 pb	Acosta et al. (no prelo)

F: foward. R: reverse. pb: pares de bases.

Tabela 2 - Parâmetros da PCR para os genes *icaA*, *icaD*, *mecA*, *blaZ*, *cap5* e *cap8*.

	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>
Reagentes						
Tampão 1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	2,5 mM	1,33 mM	3,3 mM	3,3 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP	0,28 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,25 mM	0,25 mM
Oligonucleotídeo F	1 µM	1 µM	0,4 µM	0,4 µM	1 µM	5 µM
Oligonucleotídeo R	1 µM	1 µM	0,4 µM	0,4 µM	1 µM	5 µM
Taq	2,5 U	1,5 U	1,5 U	1,5 U	0,1 U	1,5 U
DNA	5 µL	2 µL	4 µL	4 µL	20 ng	20 ng
Volume final da reação	25 µL	15 µL	15 µL	15 µL	25 µL	25 µL
Condições						
Quantidade de ciclos	30	30	15/20	30	32	32
Desnaturação inicial	-	94°C 2'	94°C 1'	94°C 4'	94°C 5'	94°C 5'
Desnaturação	92°C 5'	92°C 45"	94°C 30"/94°C 30"	94°C 4'	94°C 1'	94°C 1'
Anelamento	49°C 30"	49,8°C 45"	68°C 30"/60°C 30"	50,5°C 30"	61°C 1'	61°C 1'
Extensão	72°C 1'	72°C 1'	72°C 30"/72°C 30"	72°C 30"	72°C 1'	72°C 1'
Extensão final	72°C 7'	72°C 7'	72°C 30"/72°C 2'	72°C 5'	72°C 5'	72°C 5'

Taq DNA polimerase 5U/ µL (Ludwig Biotec). dNTP set, 100 mM (Ludwig Biotec).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a CBM, foram escolhidos os desinfetantes mais usados nos procedimentos pré-*dipping* e pós-*dipping* (clorexidine e iodo) e higienização de sala de ordenha e maquinário (cloro). Todos os desinfetantes foram diluídos em água destilada, a fim de se obter as concentrações desejadas: clorexidine 0,04% (Vicpharma), iodo 0,7% (Nuclear) e cloro 2,5% (Ciclopharma). A avaliação da CBM dos desinfetantes sobre os isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada de acordo com o protocolo M07-A9 (CLSI, 2012). Primeiramente foi adicionado 200 µL de caldo MH em cada poço das microplacas (Cral). Uma alíquota de 200 µL dos desinfetantes foi adicionada ao primeiro poço, após homogeneização, transferida para o segundo, e assim sucessivamente. Ao final das diluições se obteve as seguintes concentrações para cada desinfetante: clorexidine (0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,0025%, 0,00125%, 0,000625%, 0,0003125%, 0,00016%, 0,00008%, 0,00004% e 0,00002%), iodo (0,35%, 0,175%, 0,088%, 0,044%, 0,022%, 0,011%, 0,005% e 0,003) e cloro (1,25%, 0,625%, 0,312%, 0,156%, 0,078%, 0,039%, 0,020% e 0,001%).

O inóculo bacteriano para a microdiluição foi obtido após TSA por 24h a 37°C, em seguida foi realizada a turvação na escala de *McFarland* de 0,5 em salina 0,85%. Desta suspensão, 100 µL foram transferidos para um tubo contendo 9,9 mL de caldo MH, e após homogeneização, 20 µL foram colocados em cada poço contendo as diferentes concentrações dos desinfetantes. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 h. Após esse período de incubação, o conteúdo da microplaca foi transferido com auxílio de um replicador para placas contendo ágar MH, e novamente foram incubados em estufa por mais 24 horas a 37°C. Finalmente, a leitura para determinação da menor concentração das soluções capaz de causar a morte bacteriana, foi realizada baseada no crescimento bacteriano visível em ágar MH. Para o controle negativo foram utilizados quatro poços com caldo MH sem adição do inóculo bacteriano, a fim de verificar contaminação no meio de cultura. Assim como, para o controle positivo foram utilizados quatro poços com caldo MH e a suspensão bacteriana, para verificar a viabilidade do inóculo. Adicionalmente, foi preparado o controle do diluente em 4 poços com MH e a bactéria sem adição da

substância teste, uma vez que é importante observar se o diluente utilizado não apresenta atividade antimicrobiana. O teste foi realizado em triplicata.

4.7 PRODUÇÃO DO BIOFILME

O teste de aderência em microplacas de poliestireno permite a caracterização fenotípica da capacidade de formação de biofilme e foi adaptado de MERINO et al. (2009). Para isso, selecionou-se duas a três colônias isoladas de TSA para serem inoculadas em 3 mL de TSB acrescido com glicose a 1% (TSBg) e incubou-se a 37°C por 24 h. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 195 µL de TSBg + 5 µL do cultivo prévio em TSBg, deixando apenas 3 poços sem a bactéria para o controle negativo. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h. Decorrido esse tempo, foi realizado o descarte do sobrenadante e três lavagens com 200 µL de água destilada estéril. Em seguida, foi adicionado 100 µL de violeta genciana 0,25% (Shynt) e após 3 minutos foram realizadas 3 lavagens com água destilada estéril. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de álcool-acetona (80:20) para realizar a leitura da absorbância em leitor de microplaca modelo Expert Plus-UV (Asys) no comprimento de onda de 620 nm. A produção de biofilme foi classificada do acordo com o valor da densidade óptica (DO) da seguinte forma: sem produção de biofilme ($DO_{amostra} \leq DO_{controle\ negativo}$), fraca produção de biofilme ($DO_{controle\ negativo} < DO_{amostra} \leq 2 \cdot DO_{controle\ negativo}$), biofilme moderado ($2 \cdot DO_{controle\ negativo} < DO_{amostra} \leq 4 \cdot DO_{controle\ negativo}$) e forte produção de biofilme ($DO_{amostra} > 4 \cdot DO_{controle\ negativo}$). O teste foi realizado em triplicata.

4.8 INTERFERÊNCIA DOS DESINFETANTES NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Para avaliar a interferência dos desinfetantes sobre o biofilme em formação de *Staphylococcus* spp., foram selecionados apenas os isolados que foram classificados como forte ou moderado produtor de biofilme (Adaptado de NOSTRO et al., 2007). Os isolados foram previamente cultivados em meio TSA. Uma alça calibrada de 10 µL de cada isolado bacteriano foi transferida para um tubo contendo 3 mL de TSBg, com posterior incubação por 24 horas a 37°C. Em seguida, 100 µL

foram adicionados aos poços da microplaca contendo 100 µL da solução teste. Como controle negativo, foi utilizado 100 µL do meio de cultura. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h e após esse período, foi realizada a leitura da DO das amostras conforme descrito no item 4.8. As concentrações dos desinfetantes utilizadas nesse teste foram equivalentes à metade do valor da CBM. O teste foi realizado em triplicata.

4.9 PRODUÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

Para a análise da influência da temperatura sobre a produção de biofilme e interferência dos desinfetantes no biofilme em formação, foram utilizados os mesmos isolados classificados como fortes ou moderados produtores de biofilme. Esses isolados foram submetidos aos testes descritos nos itens 4.8 e 4.9. As temperaturas foram escolhidas de acordo com as características climáticas do local de colheita, a fim de verificar o comportamento *in vitro* dos isolados nessas condições. Utilizou-se como referência a metodologia proposta por Rode et al. (2007), com algumas adaptações: alteração do tempo de incubação 48 h para 24h e os valores de temperaturas de 16°C, 26°C, 39°C e o controle a 37°C. O teste foi realizado em triplicata.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 5[®] foi utilizado apenas para comparar o efeito dos desinfetantes no biofilme. Os dados foram submetidos ao teste de significância, e em seguida, foi realizado o teste *One-way ANOVA (nonparametric)* com pós-teste de *Tukey* para comparação dos resultados. As médias foram ditas com diferença significativa quando apresentavam valor $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram obtidas 16 amostras em Senhor do Bonfim/BA e 13 amostras em Afrânio/PE, com informações detalhadas apresentadas na tabela 3.

Tabela 3- Locais da colheita e amostras conforme o tipo de ordenha.

Propriedade	Local	Tipo de ordenha	Origem da amostra
1	Senhor do Bonfim/BA	Mecânica	(piso, teteira e mão)
2	Senhor do Bonfim/BA	Mecânica	(piso, teteira e mão)
3	Senhor do Bonfim/BA	Mecânica	(piso, teteira e mão)
4	Senhor do Bonfim/BA	Mecânica	(piso, teteira e mão)
5	Senhor do Bonfim/BA	Manual	(solo e mão)
6	Senhor do Bonfim/BA	Manual	(solo e mão)
1	Afrânio/PE	Mecânica	(piso, teteira e mão)
2	Afrânio/PE	Manual	(solo e mão)
3	Afrânio/PE	Manual	(solo e mão)
4	Afrânio/PE	Manual	(solo e mão)
5	Afrânio/PE	Manual	(solo e mão)
6	Afrânio/PE	Manual	(solo e mão)

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Durante o processo de isolamento das 30 amostras coletadas, não houve crescimento em 1 amostra de piso, 4 de solo, 3 de teteiras e 3 de mão. Portanto, foram utilizadas 19 amostras, das quais, em 3 houve o crescimento de duas colônias com colorações divergentes, totalizando os 22 isolados. Os resultados obtidos a partir da coloração de Gram e testes bioquímicos são apresentados com mais detalhes no anexo I. Com base na identificação, é possível afirmar que a maioria dos isolados encontrados pertence ao grupo SCN.

5.3 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp.

Os resultados obtidos após o antibiograma, apresentados na tabela 4, indicam que de uma maneira geral, muitos dos isolados avaliados apresentaram resistência a pelo menos uma das penicilinas. Quanto ao perfil molecular dos genes de resistência, foi possível observar que o gene *blaZ* foi o mais encontrado entre os isolados avaliados.

Tabela 4 - Perfil de susceptibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	AMP	AMO	OXA	PEN	EST	ERO	NOR	AZI	NAL	TET	CFL
1	SCN	R	R	R	R	R	-	S	R	R	R	R
2	SCN	R	R	R	R	R	-	I	R	R	R	R
3	SCN	S	S	S	S	S	-	S	R	R	R	S
4	SCN	R	R	R	R	S	-	I	R	R	R	S
5	SCN	R	R	R	R	R	-	S	S	I	I	S
6	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	R	-	S	S	I	S	S
7	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	R	-	S	S	I	S	S
9	SCN	S	R	S	S	R	-	S	S	I	S	S
10	<i>S. aureus</i>	S	S	S	R	S	-	S	S	R	S	S
11	SCN	R	R	R	R	S	-	S	S	R	S	S
12CA	CA. <i>S. aureus</i>	S	S	R	R	S	-	S	S	R	S	R
12CB	CB. <i>S. aureus</i>	I	R	R	S	S	-	S	S	R	S	R
13CA	CA. SCN	S	S	R	R	R	-	I	S	R	S	S
13CB	CB. SCN	R	R	R	R	R	-	R	S	S	S	S
15	SCN	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S
17	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R	S	-	S	R	I	S
19	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	S	S	-	S	R	S	S
20CA	CA. <i>S. aureus</i>	S	S	R	S	S	S	-	S	R	S	S
20CB	CB. SCN	R	R	S	R	S	S	-	S	R	R	S
21	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	-	S	R	S	S
23	SCN	S	S	S	S	S	S	-	S	R	I	S
24	SCN	S	S	R	S	S	S	-	S	R	S	S

Siglas: ampicilina(AMP); amoxicilina(AMO); oxacilina(OXA); penicilinaG(PEN); estreptomicina(EST); enrofloxacina(ERO); norfloxacina(NOR); Azitromicina(AZI); Ácido nalidixico(NAL); tetraciclina(TET); cefalotina (CFL). Sensível (S); Resistente (R); Intermédiano (I).

Tabela 5 - Presença dos genes *mecA* e *blaZ* nos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	Origem da amostra	<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>
1	SCN	Piso	-	+
2	SCN	Piso	-	+
3	SCN	Teteira	-	+
4	SCN	Solo	-	-
5	SCN	Teteira	-	-
6	<i>S. aureus</i>	Piso	-	-
7	<i>S. aureus</i>	Mão	-	-
9	SCN	Mão	-	-
10	<i>S. aureus</i>	Solo	-	-
11	SCN	Mão	-	-
12CA	<i>S. aureus</i>	Solo	-	+
12CB	<i>S. aureus</i>	Solo	-	+
13CA	SCN	Mão	-	-
13CB	SCN	Mão	+	+
15	SCN	Mão	-	-
17	<i>S. aureus</i>	Mão	-	+
19	<i>S. aureus</i>	Mão	-	+
20CA	<i>S. aureus</i>	Mão	-	-
20CB	SCN	Mão	-	-
21	<i>S. aureus</i>	Piso	-	-
23	SCN	Mão	-	-
24	SCN	Piso	-	-

-: ausente. +: presente.

5.4 PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram classificados, em sua maioria, como fracos produtores de biofilme. Apenas os isolados 12CA, 12CB e 17 foram moderados e os isolados 10 e 23 foram classificados como fortes (Tabela 6). Na avaliação molecular, os genes *icaA* e *icaD* foram encontrados em mais da metade

dos isolados (n=12) e 8 não apresentaram amplificação para ambos os genes (Tabela 7).

Tabela 6 - Perfil de produção de biofilme pelos dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	Origem da amostra	Média da DO	Produção de biofilme *
ATCC 25923	ATCC		0,358±0,029	Forte
1	SCN	Piso	0,140±0,013	Fraco
2	SCN	Piso	0,146±0,011	Fraco
3	SCN	Teteira	0,127±0,009	Fraco
4	SCN	Solo	0,129±0,007	Fraco
5	SCN	Teteira	0,118±0,011	Fraco
6	<i>S. aureus</i>	Piso	0,077±0,002	Fraco
7	<i>S. aureus</i>	Mão	0,074±0,002	Fraco
9	SCN	Mão	0,086±0,003	Fraco
10	<i>S. aureus</i>	Solo	0,275±0,050	Forte
11	SCN	Mão	0,104±0,006	Fraco
12CA	<i>S. aureus</i>	Solo	0,091±0,003	Moderado
12CB	<i>S. aureus</i>	Solo	0,164±0,022	Moderado
13CA	SCN	Mão	0,063±0,001	Sem produção
13CB	SCN	Mão	0,063±0,001	Sem produção
15	SCN	Mão	0,086±0,002	Fraco
17	<i>S. aureus</i>	Mão	0,198±0,018	Moderado
19	<i>S. aureus</i>	Mão	0,067±0,001	Fraco
20CA	<i>S. aureus</i>	Mão	0,082±0,011	Fraco
20CB	SCN	Mão	0,081±0,002	Fraco
21	<i>S. aureus</i>	Piso	0,096±0,026	Fraco
23	SCN	Mão	0,387±0,004	Forte
24	SCN	Piso	0,079±0,005	Fraco

Do: Densidade óptica. *DO do meio: 0,067. Os dados foram plotados como média ± e.p.m.

Tabela 7 - Presença dos genes *icaA* e *icaD* nos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	Origem da amostra	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
1	SCN	Piso	+	+
2	SCN	Piso	+	+
3	SCN	Teteira	+	+
4	SCN	Solo	-	-
5	SCN	Teteira	-	-
6	<i>S. aureus</i>	Piso	-	-
7	<i>S. aureus</i>	Mão	-	-
9	SCN	Mão	-	-
10	<i>S. aureus</i>	Solo	-	-
11	SCN	Mão	+	+
12CA	<i>S. aureus</i>	Solo	-	-
12CB	<i>S. aureus</i>	Solo	+	+
13CA	SCN	Mão	-	-
13CB	SCN	Mão	+	+
15	SCN	Mão	+	+
17	<i>S. aureus</i>	Mão	+	+
19	<i>S. aureus</i>	Mão	-	+
20CA	<i>S. aureus</i>	Mão	+	+
20CB	SCN	Mão	+	+
21	<i>S. aureus</i>	Piso	+	+
23	SCN	Mão	+	+
24	SCN	Piso	-	+

-: ausente. +: presente.

5.5 PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp. PARA OS GENES PRODUTORES DE CÁPSULA

A presença dos genes *cap5* e *cap8* nos isolados de *Staphylococcus* spp. está apresentada na tabela 8. É possível observar que houve amplificação do gene *cap5* em 5 isolados, enquanto o *cap8*, foi o gene mais encontrado nesses isolados (10).

Tabela 8 - Presença dos genes *cap5* e *cap8* nos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	Origem da amostra	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>
1	SCN	Piso	-	-
2	SCN	Piso	-	+
3	SCN	Teteira	-	+
4	SCN	Solo	-	-
5	SCN	Teteira	-	+
6	<i>S. aureus</i>	Piso	-	+
7	<i>S. aureus</i>	Mão	+	-
9	SCN	Mão	+	-
10	<i>S. aureus</i>	Solo	-	+
11	SCN	Mão	-	+
12CA	<i>S. aureus</i>	Solo	+	-
12CB	<i>S. aureus</i>	Solo	+	-
13CA	SCN	Mão	-	-
13CB	SCN	Mão	+	-
15	SCN	Mão	-	-
17	<i>S. aureus</i>	Mão	-	-
19	<i>S. aureus</i>	Mão	-	-
20CA	<i>S. aureus</i>	Mão	-	+
20CB	SCN	Mão	-	-
21	<i>S. aureus</i>	Piso	-	+
23	SCN	Mão	-	+
24	SCN	Piso	-	+

-: ausente. +: presente.

5.6 CBM DOS DESINFETANTES SOBRE OS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp.

Após a realização da CBM, observou-se que grande parte dos isolados foi sensível a clorexidine a 0,00016%, iodo a 0,044% e ao cloro a 0,078%. Os resultados estão indicados nas figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

Figura 1 - CBM de clorexidine 0,04% sobre isolados de Staphylococcus spp.

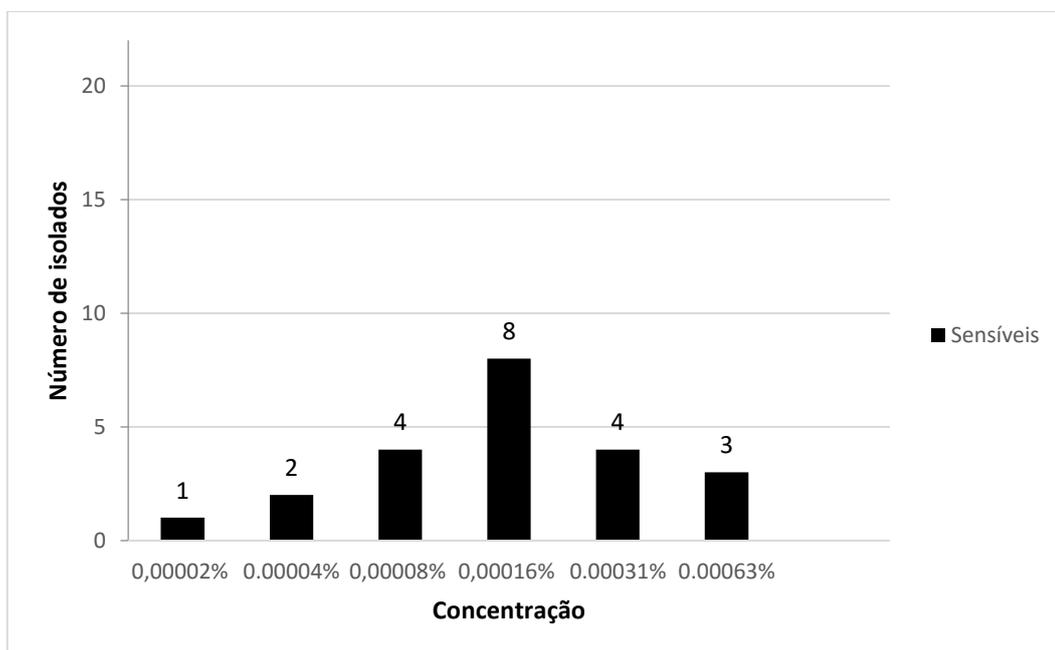


Figura 2 - CBM do iodo 0,7% sobre os isolados de Staphylococcus spp.

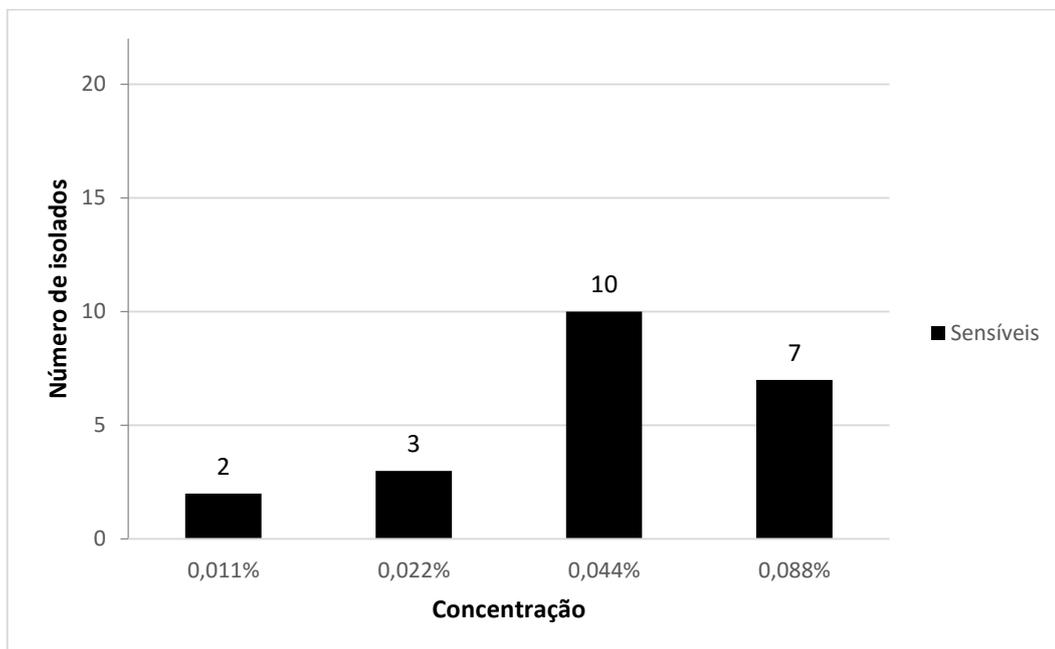
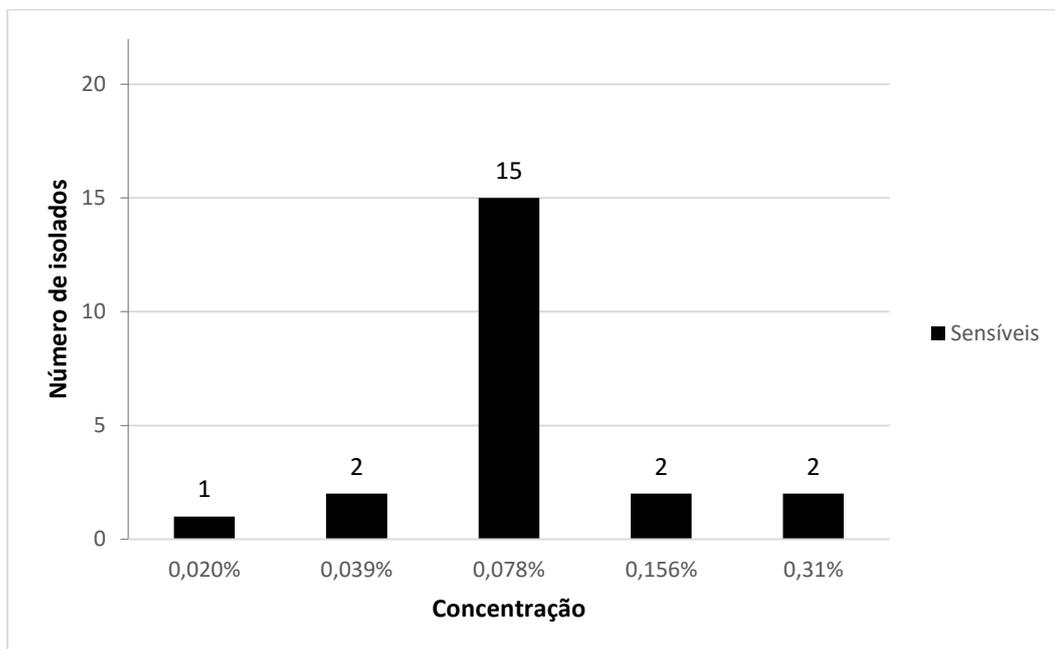


Figura 3 - CBM do cloro 2,5% sobre os isolados de Staphylococcus spp.



5.7 INTERFERÊNCIA DOS DESINFETANTES SOBRE O BIOFILME EM FORMAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp.

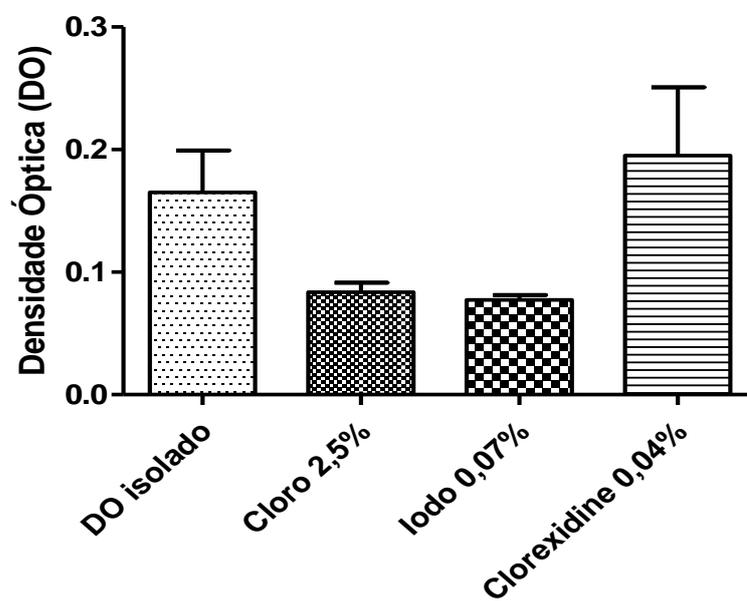
Analisando as amostras de maneira qualitativa, foi possível observar que os desinfetantes iodo e cloro tendem a ser mais eficientes em interferir com o biofilme em formação (tabela 9). No entanto, conforme pode ser visualizado na figura 6, essa diferença entre os desinfetantes não é significativa.

Tabela 9 - Interferência dos desinfetantes sobre o biofilme em formação dos isolados de *Staphylococcus* spp.

Nº da amostra	Isolados	Produção de biofilme	Clorexidine	Iodo	Cloro
10	<i>S. aureus</i>	Forte	Forte (0,288±0,065)*	Fraco (0,082±0,003)*	Fraco (0,098±0,001)*
12CA	<i>S. aureus</i>	Moderado	Fraco (0,138±0,012)*	Não produziu (0,062±0,002)*	Não produziu (0,062±0,001)*
12CB	<i>S. aureus</i>	Moderado	Fraco (0,104±0,003)*	Não produziu (0,078±0,003)*	Fraco (0,098±0,028)*
17	<i>S. aureus</i>	Moderado	Fraco (0,080±0,008)*	Fraco (0,082±0,003)*	Fraco (0,090±0,010)*
23	SCN	Forte	Forte (0,364±0,022)*	Fraco (0,110±0,012)*	Fraco (0,083±0,003)*

*DO: densidade óptica. DO do meio: 0,080. Os dados foram plotados como média ±e.p.m.

Figura 4 - Interferência dos desinfetantes sobre o biofilme em formação de *Staphylococcus* spp. As colunas representam a média \pm e.p.m. $p < 0,05$.



5.8 INTERFERÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp E AÇÃO DOS DESINFETANTES

A influência da temperatura sobre a formação de biofilme é linhagem dependente, podendo tanto estimular quanto inibir a formação. As capacidades dos desinfetantes interferirem com os isolados de *Staphylococcus* spp., em diferentes temperaturas, são apresentadas nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Relação da formação do biofilme fenotípico dos isolados em diferentes temperaturas.

Isolado	Temperatura 37°C		Temperatura 39°C		Temperatura 26°C		Temperatura 16°C	
	Média ±e.p.m	Análise Qualitativa	Média ±e.p.m	Análise Qualitativa	Média ±e.p.m	Análise Qualitativa	Média ±e.p.m	Análise Qualitativa
ATCC	0,370	Forte	0,272	Moderado	0,098	Fraco	0,075	Fraco
10	0,343	Forte	0,343	Forte	0,124	Fraco	0,093	Fraco
12CA	0,178	Moderado	0,084	Fraco	0,080	Fraco	0,071	Fraco
12CB	0,158	Moderado	0,145	Moderado	0,071	Fraco	0,069	Fraco
17	0,252	Moderado	0,252	Forte	0,324	Forte	0,079	Fraco
23	0,343	Forte	0,343	Forte	0,222	Moderado	0,440	Forte

DO – Densidade óptica; *DO do controle negativo a 37°C (0,058); DO controle negativo a 39°C (0,062);DO controle negativo 26°C (0,078) ; DO controle negativo 16°C (0,064) Os dados foram avaliados como Média ± e.p.m

Tabela 11 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença da clorexidine em diferentes temperaturas.

Isolado	Temperatura 37°C		Temperatura 39°C		Temperatura 26°C		Temperatura 16°C	
	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise
	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa
ATCC	0,109	Fraco	0,109	Fraco	0,094	Fraco	0,072	Fraco
10	0,311	Forte	0,311	Forte	0,102	Fraco	0,075	Fraco
12CA	0,147	Fraco	0,147	Moderado	0,088	Fraco	0,073	Fraco
12CB	0,104	Fraco	0,110	Fraco	0,116	Fraco	0,070	Fraco
17	0,077	Fraco	0,077	Forte	0,155	Fraco	0,071	Fraco
23	0,350	Forte	0,350	Forte	0,187	Moderado	0,106	Fraco

DO – Densidade óptica; *DO do controle negativo a 37°C (0,058); DO controle negativo a 39°C (0,062);DO controle negativo 26°C (0,078) ; DO controle negativo 16°C (0,064) Os dados foram avaliados como Média ± e.p.m.

Tabela 12 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença do cloro em diferentes temperaturas.

Isolado	Temperatura 37°C		Temperatura 39°C		Temperatura 26°C		Temperatura 16°C	
	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise
	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa	±e.p.m	Qualitativa
ATCC	0,086	Fraco	0,244	Moderado	0,237	Moderado	0,068	Fraco
10	0,098	Fraco	0,158	Moderado	0,084	Fraco	0,083	Fraco
12CA	0,062	Fraco	0,097	Fraco	0,080	Fraco	0,073	Fraco
12CB	0,072	Fraco	0,115	Moderado	0,083	Fraco	0,070	Fraco
17	0,091	Fraco	0,131	Moderado	0,188	Moderado	0,073	Fraco
23	0,085	Fraco	0,160	Moderado	0,251	Forte	0,102	Fraco

DO – Densidade óptica; *DO do controle negativo a 37°C (0,058); DO controle negativo a 39°C (0,062);DO controle negativo 26°C (0,078) ; DO controle negativo 16°C (0,064) Os dados foram avaliados como Média \pm e.p.m.

Tabela 13 - Relação da formação do biofilme fenotípico na presença do iodo em diferentes temperaturas.

Isolado	Temperatura 37°C		Temperatura 39°C		Temperatura 26°C		Temperatura 16°C	
	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise	Média	Análise
	\pm e.p.m	Qualitativa	\pm e.p.m	Qualitativa	\pm e.p.m	Qualitativa	\pm e.p.m	Qualitativa
ATCC	0,148	Fraco	0,148	Moderado	0,107	Fraco	0,063	Não produziu
10	0,079	Fraco	0,172	Moderado	0,091	Fraco	0,075	Fraco
12CA	0,060	Não produziu	0,112	Fraco	0,085	Fraco	0,072	Fraco
12CB	0,075	Fraco	0,104	Fraco	0,101	Fraco	0,091	Fraco
17	0,091	Fraco	0,110	Fraco	0,113	Fraco	0,061	Não produziu
23	0,121	Fraco	0,224	Moderado	0,186	Moderada	0,103	Fraco

DO – Densidade óptica; *DO do controle negativo a 37°C (0,058); DO controle negativo a 39°C (0,062);DO controle negativo 26°C (0,078) ; DO controle negativo 16°C (0,064) Os dados foram avaliados como Média \pm e.p.m.

6 DISCUSSÃO

As bactérias que podem causar mastite podem ser classificadas em contagiosas, nas quais o úbere infectado é a fonte de contaminação, e a trans

missão ocorre através das más práticas envolvendo, por exemplo, a ordenhadeira mecânica, as mãos humanas e insetos. Enquanto na mastite ambiental, instalações de higiene precárias propiciam condições para que os patógenos presentes no ambiente contaminem os tetos (VANDERHAEGHN et al., 2014). Nesse cenário, *S. aureus* é o principal agente patogênico implicado nos casos de mastite bovina. Porém, o número de casos desencadeados por SCN também vem ganhando destaque (FELIPE et al., 2017).

Neste estudo, as amostras obtidas foram devidamente identificadas de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas. Foram selecionadas apenas as bactérias que apresentaram coloração gram-positiva e formato de cocos. Após a realização das provas bioquímicas, foi possível identificar isolados de *S. aureus* e SCN. Esses isolados foram obtidos de amostras da mão do ordenhador, solo/piso e teteiras. De um total de 22 isolados, 13 (59,09%) foram confirmados como SCN e nove (40,90%) como *S. aureus*. A maior prevalência de SCN pode ser correlacionada com o fato dessas bactérias estarem comumente presentes no ambiente, principalmente no solo, cama, cocho, assim como, nos cascos e peles dos animais (TAPONEM; PYORALA, 2009). Elas estão associadas às infecções intramamárias, podendo causar tanto a mastite clínica quanto a subclínica (VANDERHAEGHN et al., 2014). Os microrganismos do grupo SCN já foram considerados patógenos de menor importância nas mastites bovinas. Porém, esse conceito vem sendo desconstruído, uma vez que essas bactérias têm capacidade de produzir enterotoxinas e biofilme, além de apresentarem resistência a diversos antimicrobianos (LANGONI et al., 2015; GOETZ et al., 2017). A frequência de SCN observado neste trabalho pode estar correlacionada com as práticas de manejo, principalmente com as condições de higiene durante a ordenha e manejo dos animais (LEE et al., 2012).

S. aureus tem a capacidade de causar infecções tanto no homem quanto em animais, potencial que o classifica como problema de saúde pública global (WANG et al., 2017). Apesar de ser encontrado principalmente no úbere dos animais e estar relacionado com casos de mastite clínica, a sua identificação neste estudo, em

amostras do ambiente de ordenha, pode ser justificada com os resultados do estudo realizado por Taponem et al. (2016). Eles relatam que existe um maior histórico de casos de mastite por *S. aureus* em propriedades que não adotam um sistema de manejo adequado que priorizem a saúde do animal. Em concordância, no presente estudo, a maioria dos isolados de *S. aureus* foi proveniente de propriedades que ainda não realizam a ordenha mecânica. A presença destes isolados em amostras oriundas das mãos dos manipuladores (4) é um dado relevante. O estudo realizado por Boss et al. (2016) indica a transferência zoonótica de *S. aureus*, porém, isso dependendo da estirpe. A presença desses isolados em amostras de mão pode ser justificada pela falta de cuidados com a higiene pelo manipulador, como por exemplo, não lavar as mãos antes da ordenha do animal (LANGONI, 2013).

Um importante fator de virulência tem sido a resistência aos antimicrobianos. Algumas bactérias são capazes de se tornar resistentes aos antibióticos, alterando a expressão dos seus genes ou pela aquisição de novos genes através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis (MCCALLUM et al., 2010). Neste estudo, foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos adotando diferentes classes de antibióticos. Foi observado que 31% dos isolados (n=7) apresentaram resistência a todos os antimicrobianos da classe das penicilinas, dos quais seis são SCN. Verificou-se que os isolados resistentes são encontrados em todo o ambiente da ordenha, ou seja, presentes em solo/piso, teteiras e mãos do ordenhador. De acordo com Silva et al. (2014), microrganismos do grupo SCN podem atuar como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, os quais, por sua vez, podem ser transferidos para *S. aureus*.

Com relação aos isolados de *S. aureus* (12CA,12CB,17 e 19), ficou evidente que eles são resistentes a pelo menos uma das penicilinas testadas. Essa característica pode ser condicionada à presença da enzima β -lactamase, uma vez que, foi possível confirmar a presença do gene *blaZ* nesses isolados. Adicionalmente, foi observada a presença de *S. aureus* em amostras provenientes das mãos do ordenhadores nas duas regiões coletadas (isolado 17 em Pernambuco e isolado 19 na Bahia), os quais fazem parte dos isolados citados acima que apresentam resistência a pelo menos uma das penicilinas e gene o *blaZ*. A presença desses isolados nas mãos pode ser um indicativo de transmissão zoonótica, devido ao contato entre humanos positivos para MRSA com os animais e vice-versa. A presença de MRSA em bovinos leiteiros deve ter resultado do contato com

trabalhadores rurais, uma vez que a meticilina foi pouco utilizada nos tratamentos de mastite bovina (LIM et al., 2013).

A resistência a penicilinas em *Staphylococcus* spp. está relacionada com a presença de determinados genes como o *bla_Z*, que é responsável pela ativação ou produção de penicilinas capazes de hidrolizar o anel beta-lactâmico presente nas penicilinas (FERREIRA et al., 2017). Dos isolados submetidos à reação em cadeia da polimerase para o gene *bla_Z*, nove tiveram a presença do gene confirmada. Enquanto, para o gene *mecA*, apenas um isolado apresentou o gene (13CB - proveniente de mão humana). Esse gene codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PLP), a qual possui baixa afinidade por antibióticos beta-lactâmicos. Apenas 13% (n=3) dos isolados apresentam resistência a todos os beta-lactâmicos, em contrapartida, não possuem os genes *bla_Z* e *mecA*, fato que pode indicar que a resistência desses isolados ocorre através de outro mecanismo. Recentemente foi descoberto que um novo gene, *mecC*, também pertencente ao *locus mec* e de difícil diagnóstico, atua na resistência a meticilina (PATERSON et al., 2014).

A capacidade de *S. aureus* produzir cápsula de polissacarídeo extracelular é um mecanismo de defesa eficiente, a qual confere proteção contra agressões do ambiente, além de evitar a fagocitose durante a infecção (SALIMENA et al., 2016). A maioria das cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite é encapsulada, o que reflete a importância dessa característica na doença. As cepas são classificadas majoritariamente como tipo 5 ou 8, sendo sua síntese codificada pelos genes *cap5* e *cap8*, respectivamente (CABRAL et al., 2004). No presente trabalho, foi realizada a PCR, para detecção de ambos os genes, como um indicativo da capacidade de virulência desses isolados. Foi observado que cerca de 20% (n=5) dos isolados apresentaram o gene *cap 5* e 45,45% (n=10), o gene *cap8*. Enquanto, 31,81% (n=7) dos isolados não tiveram a confirmação para ambos os genes. Observou-se, em *S.aureus*, 4 isolados com o gene *cap 8* e 3 isolados com *cap5*, enquanto para SCN, 6 isolados com o gene *cap8* e 2 isolados com *cap 5*. Apesar da capacidade de produzir cápsula ser encontrada com maior frequência em isolados de *S. aureus*, há na literatura relatos que outros *Staphylococcus* são capazes de expressar tal característica. Em estudo realizado por Flahaut et al. (2011) com isolados de *Staphylococcus haemolyticus*, foi detectado que esse microrganismo apresenta produção de cápsula extracelular. Porém, essa cápsula difere daquelas produzidas

por *S. aureus*, no tocante a um açúcar na sua composição. Eles observaram que o *locus* gênico que comanda esta produção possui homologia com o *locus cap5* ou *cap 8* de *S. aureus*.

As várias vias de resistência encontradas em isolados de *Staphylococcus* spp. é um problema sério que vem gerando grande preocupação. Neste trabalho, também se testou a resistência dos isolados aos desinfetantes frequentemente utilizados na rotina da ordenha. Eles são utilizados para procedimentos de antisepsia *pré-dipping* e *pós-dipping* (clorexidine e iodo), assim como na higienização de teteiras e desinfecção do piso das salas de ordenha (cloro). A CBM foi utilizada para verificar a sensibilidade desses isolados aos desinfetantes.

Neste estudo pode-se observar que os isolados se mostraram sensíveis aos desinfetantes utilizados. Os melhores resultados correspondem a clorexidine, como pode ser visualizado na figura 3. Esse desinfetante se mostrou eficiente mesmo em concentrações ínfimas. Os isolados que apresentaram maior sensibilidade a clorexidine na concentração de 0,00016% são de amostras de mão (57%), solo (28%) e piso (15%), os quais correspondem a 57% de *S. aureus* e 43% de SCN. Os isolados de amostras de teteiras apresentaram sensibilidade nas concentrações de 0,000635% e 0,00031%. Os outros desinfetantes também apresentaram resultados satisfatórios. Os isolados sensíveis ao iodo na concentração de 0,044% foram identificados como sendo 50% de *S. aureus* e 50% de SCN. A origem dos isolados foi em sua maioria proveniente de mão (60%), seguido por piso (20%); solo (10%) e teteira (10%). Para o cloro, os isolados se mostraram sensíveis em concentrações abaixo de 0,1%, sendo que a maioria apresentou sensibilidade na concentração de 0,078%. Esses isolados representam 61% de SCN e 39% de *S. aureus*, os quais são provenientes de mão (57%); piso (23%); solo (15%) e teteira (9%).

Neste estudo, os isolados se mostraram muito sensíveis a clorexidine mesmo em concentrações inferiores as que são comumente recomendadas para desinfecção dos tetos. Essa alta sensibilidade também foi observada em outros estudos utilizando concentrações mais baixas que 0,0002% (AZIZOGLU et al.,2013). Portanto, pode-se sugerir que a clorexidine é uma excelente opção de desinfetante para ser usado na ordenha durante os procedimentos de *pré-dipping* ou *pós-dipping*. Adicionalmente, os isolados apresentaram uma maior sensibilidade ao iodo na concentração de <0,044%. Azizoglu et al. (2013) observaram que isolados de *S.aureus* apresentaram sensibilidade a partir de concentrações >0,05%. Na

desinfecção de tetos são encontradas soluções a base de iodo em concentrações abaixo de 0,1% (MEDEIROS et al., 2009). Peixoto et al. (2015), avaliando a interferência do iodo a 0,7% (concentração muito utilizada no pós-*dipping*) sobre o biofilme consolidado de *S. aureus* e SCN, observaram que esta concentração foi capaz de reduzir a adesão das células, fator relevante, uma vez que o intuito do pré-*dipping* é evitar a aderência de bactérias ao teto, prevenindo assim a mastite. Para o cloro, a maior sensibilidade foi observada em concentrações abaixo de 0,1%, o que corrobora com os resultados encontrados por Almatroudi et al. (2016), nos quais as concentrações de hipoclorito até 0,1% (1000 ppm) foram capazes de inibir o crescimento de isolados de *S. aureus*.

Este trabalho evidencia resultados interessantes, uma vez que a partir da CBM, foi possível verificar que os isolados apresentam perfis variados de sensibilidade frente aos desinfetantes. Para Medeiros et al. (2009), isso pode estar relacionado com o local de coleta, ou seja, bactérias isoladas de locais diferentes podem apresentar diferentes perfis de sensibilidade. Para Avancine e Both (2017), a resistência das bactérias aos desinfetantes está relacionada com fatores intrínsecos do organismo, seja pelo aumento da tolerância devido à exposição ao produto, seja através da resistência adquirida. Essa resistência pode ocorrer de duas formas: resistência cruzada com diferentes agentes antimicrobianos atacando o mesmo alvo ou co-resistência, quando genes, que especificam um fenótipo de resistência, estão agrupados em um mesmo elemento genético móvel, tal como um plasmídeo, *transposon* ou *integron* (AVANCINE; BOTH, 2017).

Um importante mecanismo de defesa de *Staphylococcus* spp. é biofilme, o qual é definido como aglomerados celulares inseridos em uma matriz extracelular com características específicas (MARQUES et al., 2013). Neste trabalho, a produção de biofilme pelos isolados foi realizada através da quantificação de aderência em microplaca. Dos 22 isolados, 90,9% (n=20) foram classificados como produtores de biofilme, entre os quais: fracos (n=15), moderados (n=3) e fortes (n=2). Apenas dois isolados (9,1%) não produziram essa estrutura. A habilidade de produzir biofilme está presente na maioria das espécies de *Staphylococcus* spp. Esse mecanismo de permite a sobrevivência da bactéria no ambiente por longos períodos, além de impedir a ação de antibióticos e desinfetantes (TREMBLAY et al., 2014). Dos nove isolados de *S. aureus*, todos apresentaram produção de biofilme, classificada em 55% do isolados a produção foi fraca (n=5); 33% produção moderada (n=3) e 11%

forte (n=1). De acordo com Dhanawade et al. (2010), a característica de formar biofilme em *S. aureus* ajuda a bactéria a sobreviver a ambientes hostis e dentro do hospedeiro. Na glândula mamária, o biofilme facilitará a adesão e colonização das bactérias, além de evitar os mecanismos da defesa imunológica, fato que dificulta a erradicação do patógeno e contribui para implementação de infecções crônicas ou persistentes (DHANAWADE et al., 2010).

Das amostras avaliadas, as que mais apresentaram habilidade na produção de biofilme foram de isolados obtidos das mãos dos manipuladores, com produção variando de forte a moderada. Dentre esses isolados, quatro foram de *S. aureus* (7, 17, 19 e 20CA), as quais são frequentemente encontradas sobre as mucosas e superfície da pele humana e de animais (KHORAMIAN et al., 2015). As más práticas sanitárias durante a ordenha por parte dos manipuladores ou ordenhadores (ordenha manual) ocasionam a contaminação do leite por estirpes de *S. aureus* presentes nos humanos ou animais (LANGONI et al., 2013).

Neste estudo, também se observou que dos 20 isolados que produziram biofilme, 55% dos SCN (11) apresentaram a capacidade de produzir biofilme de moderado a forte.). A produção de biofilme por SCN pode ser um fator de virulência importante na adesão, a fim de evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro, além de garantir a permanência dessas bactérias, principalmente na glândula mamária (DHANAWADE et al., 2010; VANDERHAEGHEN et al., 2014). Os biofilmes em SCN conferem proteção contra concentrações bactericidas de antibióticos ou desinfetantes. A presença desses biofilmes, próximo ao fim do ciclo de lactação ou no ambiente da fazenda, pode influenciar negativamente na prevenção e recorrência de infecções por SCN (TREMBLAY et al., 2014).

A produção de biofilme é regulada por um conjunto de genes que ficam localizados no *locus ica*, os quais são responsáveis pela adesão intercelular. No *operon icaABCD*, os genes *icaA* e *icaD* têm maior relevância em *S. aureus* e *Staphylococcus epidermis* (DHANAWADE et al., 2010). Neste estudo, foi realizada a PCR para os genes *icaA* e *icaD* e os resultados obtidos demonstraram que mais metade dos isolados (n=12) possui ambos os genes. A presença desses genes confirma que os isolados têm potencial genético de formar biofilme (KRONING et al., 2016). A presença dos genes nos isolados de SCN foi relativamente alta, cerca de 66,7% (n=8) entre os isolados positivos. Muitos estudos têm avaliado a produção do biofilme em isolados SCN de mastites e seu papel nas infecções intramamárias. A

presença de biofilme nesses isolados pode favorecer a sua persistência e transmissão ambiental (GOETZ et al., 2017). Apenas 33,3% (n=4) dos isolados positivos para ambos os genes eram de *S. aureus*. A identificação desses genes nessas bactérias tem sido relatada na literatura, como um importante indício do envolvimento na patogênese da mastite, visto que a formação do biofilme interfere no tratamento da glândula mamária (CASANOVA et al., 2014).

É importante salientar que oito isolados não apresentaram os genes *icaA* e o *icaD*, porém, durante a avaliação da produção de biofilme fenotípico, cinco foram classificados como produtores de biofilme, mesmo que em sua maioria com fraca produção (isolados 4, 5, 6, 7, 9), com produção moderada (12CA) ou com produção de biofilme forte (10). Este resultado já foi relatado na literatura, sob a hipótese de que os genes do *locus ica* não são os únicos encarregados pela formação do biofilme, pois alguns isolados apresentam mecanismos independentes do *operon ica*. Variações da expressão gênica do *locus ica* em isolados de *S. aureus* têm sido relatadas, principalmente, quando submetidos a diferentes temperaturas, tempos e superfícies de contato (KRONING et al., 2016). Em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastites bovinas, foram identificados biofilmes dependentes de Bap. Essa proteína está relacionada com a adesão e acumulação intercelular em aglomerados de células multicamadas, e também na ligação primária a superfícies abióticas. O gene que codifica esta proteína também recebe o mesmo nome *bap* e cepas que o apresentam possuem um fenótipo para a formação de biofilme (SNEL et al., 2015).

O teste de interferência dos desinfetantes sobre a formação do biofilme foi realizado apenas com os isolados que apresentaram biofilme com produção classificada de forte a moderada, utilizando a metade do valor obtido na CBM e cultivados a temperatura de 37°C. Dentre os isolados que apresentaram produção de biofilme fenotípica forte e moderada, dois não possuíam os genes *icaA* e *icaD*, o isolado 10 e o isolado 12CA, respectivamente. Desta forma, os isolados testados foram 10, 12CA, 12CB, 17 que correspondem a *S. aureus* e o isolado 23 que corresponde a SCN.

A ação de desinfetantes sobre o biofilme de bactérias é um mecanismo que requer atenção, uma vez que podem surgir isolados bacterianos resistentes, fato que pode comprometer o uso desses agentes (VETAS et al., 2017). Foi notável que apenas dois dos desinfetantes testados, cloro e iodo, foram capazes de diminuir a

formação de biofilmes de todos os isolados. Enquanto, a clorexidine só foi capaz de interferir com a formação de biofilme em apenas três isolados (12CA, 12CB e 17). Os outros isolados (10 e 23) não apresentaram redução na formação do biofilme, o que pode ser um indicativo de resistência a esse desinfetante. Apesar dos resultados mencionados, essas alterações desencadeadas pelos desinfetantes não foram estatisticamente significativas. Para Otter et al. (2015), a sensibilidade reduzida dos biofilmes aos agentes biocidas (desinfetantes) tem diferentes causas: como a penetração reduzida, crescimento lento e modulação da resposta ao estresse, além de fatores relacionados com processos metabólicos. A composição do biofilme também influencia na susceptibilidade reduzida. Desta forma, os biofilmes que apresentam uma matriz extracelular densa e com alto teor de nutrientes são menos susceptíveis a esses agentes (OTTER et al., 2015). Apesar da maioria dos isolados testados apresentar sensibilidade aos desinfetantes testados, a presença de biofilme nas propriedades é indicativo de falha na desinfecção.

Para que a formação do biofilme ocorra é necessário que haja condições favoráveis como nutrientes e condições relacionadas ao ambiente como temperatura, umidade e pH (ABDALLAH et al., 2015). Com relação à formação de biofilme em diferentes temperaturas de incubação, o ensaio foi realizado com o intuito de verificar o comportamento desses isolados em temperaturas semelhantes às aquelas encontradas no ambiente de coleta, e a partir disso, verificar como este fator interfere sobre a formação do biofilme. Neste estudo, foi possível observar que o isolado 10, uma amostra de solo de *S. aureus*, apresentou uma tendência à redução da formação de biofilme nas temperaturas de 16°C e 26°C, quando comparada com a temperatura controle de 37°C. Os resultados obtidos neste ensaio estão de acordo com o estudo realizado por Rode et al. (2007), no qual verificou-se que os biofilmes de *S. aureus* apresentam formação de biofilme mesmo em condições de crescimento sub-ótimas, ou seja, em temperaturas dentro de um intervalo de 20°C a 48°C. Porém, os mecanismos responsáveis pela formação de biofilme nessas condições adversas ainda não são bem conhecidos.

No que se refere ao efeito dos desinfetantes sobre o biofilme em formação nas diferentes condições de temperatura, pode-se dizer que este é o primeiro estudo com isolados obtidos a partir do ambiente de ordenha. Ficou evidente que a temperatura ambiental tem uma grande correlação com a produção do biofilme, e

este fator pode ser determinante no efeito dos desinfetantes sobre o biofilme. Observou-se que os desinfetantes em certas temperaturas eram capazes de estimular a produção do biofilme de alguns isolados, isso pode ser justificado pelo fato de que as bactérias modificam sua fisiologia em resposta a condições adversas para se adaptar a novas condições ambientais (ABDALLAH et al.,2014).

Portanto, este estudo buscou contribuir com informações importantes sobre o conhecimento do comportamento desses isolados nestas condições, o que torna possível a adoção de medidas para diminuir o risco de contaminação e de persistência destas bactérias no ambiente de ordenha.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, foi demonstrado que *S. aureus* e SCN estão presentes no ambiente de ordenha em propriedades do semiárido, assim como, ficou comprovado que muitos apresentam importantes fatores de virulência, a exemplo da produção de biofilme e resistência a antimicrobianos. Dados que são reforçados pela presença dos genes responsáveis por produzir essas características, como *icaA/icaD* e *blaZ*, respectivamente. De maneira geral, os isolados foram sensíveis aos desinfetantes como CBM abaixo das concentrações recomendadas. Adicionalmente, verificou-se uma relativa interferência desses agentes sobre a formação de biofilme.

Os resultados referentes à influência da temperatura sobre a produção de biofilme e sobre a ação dos desinfetantes nessas estruturas ainda são preliminares, e precisam de análises mais aprofundadas para a confirmação das tendências de inibição encontradas em alguns isolados.

Por fim, é importante salientar que os isolados presentes no ambiente de ordenha apresentam um alto potencial patogênico, o que constitui um importante risco à produção animal e a saúde humana. Esse trabalho teve como objetivo isolar bactérias do gênero *Staphylococcus* em locais de ordenha de propriedades do semiárido, e identificar diversos fatores de virulência. Espera-se com o conhecimento obtido, conscientizar os produtores da importância das boas práticas de higiene, a fim de minimizar os impactos gerados pela mastite.

Referências

ABDALLAH, M., CHATAIGNE, G., FERREIRA-THERET, P., BENOLIEL, C., DRIDER, D., DHULSTER, P., & CHIHIB, N. E. Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. ***Applied microbiology and biotechnology***, v.98 n.6, 2597-2607, 2014.

ABDALLAH, M., KHELISSA, O., IBRAHIM, A., BENOLIEL, C., HELIOT, L., DHULSTER, P., & CHIHIB, N. E. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. ***International journal of food microbiology***, v. 214, p. 38-47, 2015.

ACOSTA,A.C.; SILVA, L.B.G.; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***. v. 36, n. 7, p.565-573,2016.

ALMATROUDI, A., GOSBELL, I. B., HU, H., JENSEN, S. O., ESPEDIDO, B. A., TAHIR, S.,VICKERY, K. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. ***Journal of Hospital Infection***, n. 93 v.3,p. 263-270, 2016.

AMORIM, R. N. L.; SOUZA, A. O. G.; LIMA,P. M. ; BEZERRA, F. S. B.; ALVES, N. D.; FEIJÓ,F. M. C. Mastite clínica em bovino causada por *Prototheca zopfii* no estado do Ceará. ***Acta Veterinaria Brasilica***.. v.4, n.4, p.307-311, 2010.

AMARAL L. A. D.; ISA, H.; DIAS, L. T.; ROSSI JR, O. D.;NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, p. 173-177, 2004.

ARTURSSON,K. ; SÖDERLUNDA, R. ; LIUA, L.; MONECKEB, S.; SCHELIND, J. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. ***Veterinary Microbiology***, v.193,p.156–161,2016.

ASLANTAS, Ö; DEMIR,C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal Dairy Science**, v.99, p.1-7, 2016.

AVANCINI, C. A. M.; BOTH, J. M. C. Atividade bactericida de três desinfetantes sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, 2017.

AZEVEDO, CARLA; PACHECO, DIANA; SOARES, LUÍSA; ROMÃO, RICARDO; MOITOSO, MÓNICA; MALDONADO,JAIME; GUIX,ROGER; JOÃO, SIMÕES. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). **Tropical Animal Health Produce**, v.48, p.451–459, 2016.

BAPTISTA, I. ; QUEIRÓS, R. P.; CUNHA, A.; SARAIVA, J. A.; ROCHA,S. M.; ALMEIDA ,A. Inactivation of enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains by high pressure treatments and evaluation of its impact on virulence factors.

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

BAMBACE, A. M. J., DE ALMEIDA BARROS, É. J., DOS SANTOS, S. S. F., & JORGE, A. O. C .Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências**, v. 9, n. 2, 2008.

BEURON, D.C.;CORTINHAS, C.S.; BOTARO, B.G.; MACEDO, S.N.; GONÇALVES, J.L.; BRITO,M.A.V.P.; SANTOS, M.V. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 34,n.10,p. 947-952, 2014.

BOSS, R.; COSANDEY, A.; LUINI, M.; ARTURSSON, K.; BARDIAU, M.; BREITENWIESER, F.; HEHENBERGER, E.; LAM, TH.; MANSFELD, M.; MICHEL,

A.; MÖSSLACHER, G.; NASKOVA, J.; NELSON, S.; PODPEČAN, O.; RAEMY, A.; RYAN, E.; SALAT, O.; ZANGERL, P.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. **Journal Dairy Science** n. 99, p.1–14, 2016.

BOZIC, D. D.; MILENKOVIC, M.; IVKOVIC; CIRKOVIC, B. I. Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.263-270, 2014.

CABRAL, K. G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; DE SA, M. E.; VICTÓRIA, C.; DA SILVA, A. V. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from Sao Paulo State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 901-909, 2004.

CARNEIRO, DEOLINDA MARIA VIEIRA FILHA; DOMINGUES, PAULO FRANCISCO; VAZ, ADIL KNAKFUSS. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, 2009.

CASANOVA et al., Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus* . **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1369-1378, 2016

CASANOVA, V. P.; APPIO, J.; KOHL, E.; MICHAELSEN, T. R.; PAIM, D. S.; BRUNETTO, T. R.; ... KOLLING GIRARDINI, L. Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, 2016.

CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; LIMA, A. M. C.; A. M. C.; RAMOS, G. B.; RÖDER, D. V. D. B.; NADER-FILHO, A. Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em condições de biofilme. **Vetinary Reseach Animal Science**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 228-233, 2015.

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E. ;DUARTE, F.R.; TSAI, S.M. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.60, n.2, p.299-306, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Document M02-A12 **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standards - Twelfth Edition,2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document **M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard**, 19 Edition,2012.

CONDAS, L. A., DE BUCK, J., NOBREGA, D. B., CARSON, D. A., ROY, J. P., KEEFE, G. P., et al. Distribution of non-*aureus staphylococci* species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. **Journal of dairy science**. n.100, p.1–15 ,2017.

CUNHA,R.P.L.; MOLINA,L.R.; CARVALHO, A.U. ;FACURY FILHO,E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI M.B . Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DHANAWADE, N. B.; KALOREY, D. R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE, S. B.; KURKURE, N. V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary research communications**, v. 34, n. 1, p. 81-89, 2010.

DOULGERAKI, A. I.; DI CICCIO, P., IANIERI, A.; NYCHAS, G.J. E. Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of Q15 current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. **Research in Microbiology** ,v.168, p 1-15,2016.

DUKES, H.H.; REECE, W.O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.926, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). A dinâmica da produção de leite nos últimos 20 anos. Embrapa gado de leite. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/sistemaproducao>

FELIPE, V; MORGANTE, C.A.; SOMALE, P.S.; VARRONI, F.; ZINGARETTI, M.L.; BACHETTI, R.A.; CORREA, S.G; PORPORATTO. C. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. **Microbial Pathogenesis**, v.104, p.278-286, 2017.

FERREIRA, A. M.; MARTINS, K. B.; SILVA, V. R. D.; MONDELLIC, A. L.; CUNHA, M. D. L. R. D. S. D. Correlation of phenotypic tests with the presence of the *blaZ* gene for detection of beta-lactamase. **Brazilian journal of microbiology**, n. 48 p.159–166, 2017.

FLAHAUT, S.; VINOGRADOV, E.; KELLEY, K. A.; BRENNAN, S.; HIRAMATSU, K.; LEE, J. C. Structural and Biological Characterization of a Cápsular Polysaccharide Produced by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Bacteriology**, p. 1649–1657, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS – **FAO**, Food and Nutrition in Numbers. p. 20,2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS – **FAO**, Food Outlook (Biannual Report Global Food Markets). p.48, 2016.

GOETZ, C.; TREMBLAY, Y. D.; LAMARCHE, D.; BLONDEAU, A.; GAUDREAU, A. M.; LABRIE, J.; ... JACQUES, M. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. **Journal of Dairy Science**, 2017.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. New York, **Current Microbiology**, v.72, n.4, p.377-82, 2016.

GOODFELLOW M.; KÄMPFER, P.; HANS-JÜRGEN B. ;MARTHA, E. T.; SUZUKI ,K. ; LUDWIG, W. ; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, 2015.

IUNG, E.;PONTES, J. B;COZER M. A. M. Avaliação das condições higiênico-sanitárias e análise microbiológica de manipuladores em um hospital no sudoeste do Paraná. **Multiciência**, v. 12: 56 - 64, São Carlos, 2013.

KEHRLI, M.; HARP, J. A. Immunity in the mammary gland. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 17, n. 3, p. 495-516, 2001.

KHORAMIAN, B.; JABALAMELI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. **Microbial pathogenesis**, v. 88, p. 73-77, 2015.

KLEIN, Bradley G. Glândula mamária. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Elsevier Brasil, 2015.

KRONING, I. S.; IGLESIAS, M. A.; SEHN, C. P.; GANDRA, T. K. V.; MATA, M. M.; DA SILVA, W. P. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food microbiology**, v. 58, p. 105-111, 2016.

KRONING, I.S.; IGLESIAS, M.A.; SEHN,C.P. ;GANDRA, T.K. V.; MATA,M.M.; SILVA, W.P. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v.58 p.105-111,2016.

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

LANGONI, H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; LUCHEIS, S.B., MENOZZI, B.D.; SILVA A.V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31,n.12, p.1059-1065,2011.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; COSTA, E.O.; JOAQUIM, S.F.; MENOZZI, B.D.; Celularidade do leite e Unidades Formadoras de Colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n.35,v.6, p.518-524,2015.

LEE , S. H. I.; CAMARGO, C. H.; GONÇALVES , J. L.; CRUZ, A. G.; SARTORI ,B. T.; MACHADO, M. B.; OLIVEIRA,C. A. F. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science** v. 95, n. 12, p. 7377-7383, 2012.

LIM, S. K.; NAM, H. M.; JANG, G. C.; LEE, H. S.; JUNG, S. C.; KIM, T. S. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment, and workers in dairy cattle farms. **Foodborne pathogens and disease** v 10, n 8, 2013.

MACHADO, L.C.P. & MACHADO FILHO, L.C.P. A dialética da Agroecologia. 1ª ed. São Paulo: Expressão Popular, (2014).

MALEK DOS REIS, C. B.; BARREIRO, J. R.; L. MESTIERI,; PORCIONATO, M. A. D. F.; SANTOS,M. V. D. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. **BMC Veterinary Research**, v.9,n.67,p. 2-7,2013.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L.; ALENCAR, T.A.; PRIBUL, B.R.; COELHO, S.M.O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. Análise fenotípica e

genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.161-170, 2013.

MCCALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. M.; Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 300 P.118–129, 2010.

MEDEIROS, E.S.; MEDEIROS E.S., SANTOS M.V., PINHEIRO JR J.W., FARIA E.B., WANDERLEY G.G., TELES J.A.A.; MOTA R.A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina, **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n.29 v.1 p.71-75, 2009.

MOORMEIER, D.E.; BAYLES, K.W. Staphylococcus aureus Biofilm: A Complex Developmental Organism. **Molecular Microbiology**, 2017.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J., SOLANO, C.; CALVO, E.; LASA, I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, n. 191, v3, p.832-843 ,2009.

MORITZ, F.; MORITZ, C .M. F. Resistência aos antimicrobianos em staphylococcus spp. Associados à mastite bovina. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2017.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, n.56, p.519-523, 2007.

OLIVEIRA, C.S.F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A.M.; MAIA, P.V. COELHO, S.G.; HADDAD, J.P.A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**. v.121 p.297–305,2015.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology** January, Vol. 22, No. 1, 2014.

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

PRADOA, M.E.; ALMEIDAA, R.A.; OZENB, C.; LUTHERA, D.A.; LEWISA,M.J. HEADRICKA, S.J.; OLIVERA,S.P. Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 141, p.201–208,2011.

RIBEIRO M.G., GERALDO J.S., LANGONI H., LARA G.H.B., SIQUEIRA A.K., SALERNO T.; FERNANDES M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**. v. 29,n.1,p.52-58,2009.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology** n. 116, p. 372–383, 2007.

RODOSTITS,O.M.; OTTO, M.; ARUDEL,J.H. **Clinica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, suínos, caprinos, e equinos**. Tradução de Adriana de Souza Coutinho et.al. Rio de Janeiro,Guanabara Kogan,2010,p 542 e 561.

RODRIGUES, E. A. C., MENDONÇA, J. S. D., AMARANTE, J. M. B., ALVES FILHO, M. B., GRINBAUM, R. S., & RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. In *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. Sarvier. cap.4, p.426-434, 1997.

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

SADEK, K.; SALEH, E.; AYOUB, M. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. **Tropical animal health and production**, v. 49, n. 2, p. 431-437, 2017.

SALIMENA, A. P.; LANGE, C. C.; CAMUSSONE, C.; SIGNORINI, M.; CALVINHO, L. F.; BRITO, M. A.; PICCOLI, R. H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. **Veterinary research communications**, v. 40, n. 3-4, p. 97-106, 2016.

SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; AVELLAR-COSTA, P.; SANTOS, K. R. N.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Staphylococcus chromogenes, a coagulase-negative Staphylococcus species that can clot plasma. **Journal Clinical Microbiology** v.54, p.1372–1375, 2016.

SCHÖNBORN, S.; KRÖMKER V. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. **Veterinary Microbiology** v.196, p.126–128, 2016

SILVA, N. C. C.; GUIMARAES, F. F.; MANZI, M. D. P.; GOMEZ-SANZ, E.; GOMEZ, P.; ARAUJO-JUNIOR, J. P.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 106, n. 2, p. 227-233, 2014.

SILVA, N. et al., Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, **Livraria Varela**, São Paulo, p. 552, 2007.

SNEL, G. G.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; PICCININI, R. Molecular characteristics of bap-positive *Staphylococcus aureus* strains from dairy cow mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 3, p. 312-316, 2015.

SOUZA, F.N.; CUNHA, A.F.; ROSA, D.L.S.O.; BRITO, M.A.V.; GUIMARÃES, A.S.; MENDONÇA, L.C.; SOUZA, G.N.; LAGE, A.P.; BLAGITZ, M.G.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA M.M.O.P. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.9, p.811-818, 2016.

TAPONEN S., PYORALA S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v.134, p. 29–36, 2009.

TAPONEN, S.; LISKI, E.; HEIKKILÄ, A. - M.; PYÖRÄLÄ, S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science** v. 100, p.1-11, 2016.

THOMPSON-CRISPI et al. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics . **Frontiers in Immunology**. v.5, n.493, 2014.

TREMBLAY, Y. D.; CARON, V.; BLONDEAU, A.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3, p. 511-518, 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (**USDA**). Dairy. Cows milk production and consumption: summary for selected countries. In: PSD online: production, supply and distribution. Washington, DC: USDA, 2016.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESEBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Invited review: Effect, persistence, and

virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 9, p. 5275-5293, 2014.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Current microbiology**, v. 66, n. 2, p. 110-121, 2013.

WALLER, K. P.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; ANDERSSON, U. G. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.112–116, 2011.

WANG, D.; ZHANG, L.; ZHOU, X.; HE, Y.; YONG, C.; SHEN, M.; SZENCI, O.; HAN, B. Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. **Journal of dairy science**, n.99, v.12, p.9560-9569, 2016.

WADE, K.A.; POUNDER, J.I.; CLOUD, J.L.; WOODS, G.L. Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed Sputum for testing by quantitative Real-time PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2461-2473, 2005.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E151-E155, 2001.

WINTER, J., ILBERT, M., GRAF, P. C. F., ÖZCELİK, D., & JAKOB, U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. **Cell**, n.135,v.4, p.691-701. 2008.

YAMAMURA, A. A. M. et al., Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 105-114, 2007.

ZHANG,Z.; LI, X. P.; YANG,F.; LUO,J.Y.; WANG,X.R.; LIU,L.H.; LI,H.S. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.99,n.8,p.1–10, 2016.

ANEXO I – PARECER DO CEDEP.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO VALE DO SÃO
FRANCISCO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Produção de biofilme e resistência aos desinfetantes por *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes superfícies

Pesquisador: Mateus Matluzzi da Costa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55495016.1.0000.5196

Instituição Proponente: UNIVASF

Patrocinador Principal: Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.794.433

Apresentação do Projeto:

1. O projeto de pesquisa está ligado à dissertação do programa de Ciências Veterinárias da Univasf e a sua equipe executora é composta por: Gracielle Alves dos Santos (mestranda) e o Prof. Mateus Matluzzi (orientador).

O projeto contempla todas as seções essenciais para a análise ética.

Objetivo da Pesquisa:

2. Os objetivos estão bem delineados, são exequíveis, estão em acordo com a metodologia proposta e podem ser atingidos no prazo estipulado pelo cronograma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

3. Foi realizada uma análise dos riscos pertinente, com previsão de estratégias para minimizá-los, assim como foram apresentados os potenciais benefícios que a pesquisa pode propiciar aos seus participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

4. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Endereço: Avenida José de Sá Marinho, s/n
Bairro: Centro CEP: 56.304-205
UF: PE Município: PETROLINA
Telefone: (87)2101-8898 Fax: (87)2101-8898 E-mail: cedepe@univasf.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO VALE DO SÃO
FRANCISCO



Continuação do Parecer: 1.794.433

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

5. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

6. Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

7. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

É com satisfação que informamos formalmente a Vª. Srª. que o projeto "Produção de biofilme e resistência aos desinfetantes por *Staphylococcus aureus* Isolados de diferentes superfícies" foi aprovado pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas (CEDEP) da UNIVASF. A partir de agora, portanto, o vosso projeto pode dar início à fase prática ou experimental. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este comitê um relatório sucinto sobre o andamento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BASICAS DO PROJETO_669388.pdf	25/09/2016 20:04:36		Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_resposta_2.pdf	25/09/2016 20:02:49	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_3.pdf	25/09/2016 20:01:24	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
Outros	CARTA_convite2.pdf	25/09/2016 19:59:14	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_ORIENTADOR_2.pdf	02/08/2016 17:26:10	Clean Sá	Acelto
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_ORIENTADA_2.pdf	02/08/2016 17:26:00	Clean Sá	Acelto
Outros	TCLE_2.pdf	02/08/2016 17:25:00	Clean Sá	Acelto
Outros	PROJETO_DETALHADO_2.pdf	02/08/2016 17:24:51	Clean Sá	Acelto
Outros	orcamento_2.pdf	02/08/2016 17:24:40	Clean Sá	Acelto

Endereço: Avenida José de Sá Mençobá, s/n
Bairro: Centro CEP: 58.304-205
UF: PE Município: PETROLINA
Telefone: (87)2101-8898 Fax: (87)2101-8898 E-mail: cedepe@univasf.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO VALE DO SÃO
FRANCISCO



Continuação do Parecer: 1.794.433

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

5. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

6. Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

7. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

É com satisfação que informamos formalmente a Vª. Srª. que o projeto "Produção de biofilme e resistência aos desinfetantes por *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes superfícies" foi aprovado pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas (CEDEP) da UNIVASF. A partir de agora, portanto, o vosso projeto pode dar início à fase prática ou experimental. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este comitê um relatório sucinto sobre o andamento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BASICAS_DO_PROJETO_669388.pdf	25/09/2016 20:04:36		Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_resposta_2.pdf	25/09/2016 20:02:49	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_3.pdf	25/09/2016 20:01:24	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
Outros	CARTA_convite2.pdf	25/09/2016 19:59:14	Mateus Matluzzi da Costa	Acelto
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_ORIENTADOR_2.pdf	02/08/2016 17:26:10	Clean Sá	Acelto
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_ORIENTADA_2.pdf	02/08/2016 17:26:00	Clean Sá	Acelto
Outros	TCLE_2.pdf	02/08/2016 17:25:00	Clean Sá	Acelto
Outros	PROJETO_DETALHADO_2.pdf	02/08/2016 17:24:51	Clean Sá	Acelto
Outros	orcamento_2.pdf	02/08/2016 17:24:40	Clean Sá	Acelto

Endereço: Avenida José de Sá Meneses, s/n
 Bairro: Centro CEP: 58.304-205
 UF: PE Município: PETROLINA
 Telefone: (87)2101-8898 Fax: (87)2101-8898 E-mail: cedepe@univasf.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO VALE DO SÃO
FRANCISCO



Continuação do Parecer: 1.794.433

Outros	folhaderosto_2.pdf	02/08/2016 17:23:41	Clean S3	Aceito
Outros	ANEXO1_MODELO_LAUDO_2.pdf	02/08/2016 17:21:21	Clean S3	Aceito
Outros	ANEXO1_MODELO_LAUDO.pdf	28/07/2016 00:32:03	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	28/07/2016 00:30:59	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso_ORIENTADOR .pdf	28/07/2016 00:10:03	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso_ORIENTADO. .pdf	28/07/2016 00:09:33	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	27/07/2016 23:57:51	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/05/2016 21:27:39	Mateus Matluzzi da Costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PETROLINA, 26 de Outubro de 2016

Assinado por:
DEUZILANE MUNIZ NUNES
(Coordenador)

Endereço: Avenida José de Sá Meneses, s/n
Bairro: Centro CEP: 56.304-205
UF: PE Município: PETROLINA
Telefone: (87)2101-8898 Fax: (87)2101-8898 E-mail: cedep@univalef.edu.br

ANEXO I – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Staphylococcus* spp.

Local de coleta	Tipo da amostra	Número	Gram	Catalase	Oxidase	PAB	Coagulase em lâmina	Coagulase em tubo	DNase	Hemólise	Identificação
SBF/BA	P3 (PISO)	1	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
SBF/BA	P6 (PISO)	2	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
SBF/BA	P3 (TETEIRA)	3	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
SBF/BA	P1 (SOLO)	4	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
AFRÂNIO/PE	P1 (TETEIRA)	5	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
AFRÂNIO/PE	P1 (PISO)	6	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>

AFRÂNIO/PE	P1 (MÃO)	7	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
AFRÂNIO/PE	P2 (MÃO)	9	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus sp. (SCN)</i>
AFRÂNIO/PE	P3 (SOLO)	10	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
AFRÂNIO/PE	P3 (MÃO)	11	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus sp. (SCN)</i>
AFRÂNIO/PE	P4 (SOLO)CA	12CA	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
AFRÂNIO/PE	P4 (SOLO)CB	12CB	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>
AFRÂNIO/PE	P4 (MÃO) CA	13CA	Cocos+	+	-	-	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus sp. (SCN)</i>

AFRÂNIO/PE	P4 (MÃO) CB	13CB	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
AFRÂNIO/PE	P5 (MÃO)	15	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
AFRÂNIO/PE	P6 (MÃO)	17	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
SBF/BA	P2 (MÃO)	19	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
SBF/BA	P4 (MÃO)CA	20CA	Cocos+	+	-	+	+	+	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
SBF/BA	P4 (MÃO)CB	20CB	Cocos+	+	-	+	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
SBF/BA	P8 (PISO)	21	Cocos+	+	-	-	+	+	+	Positiva(alfa- hemolise)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>

SBF/BA	P8 (MÃO)	23	Cocos+	+	-	-	-	-	-	negativo	<i>Staphylococcus</i> SP. (SCN)
SBF/BA	P3 (PISO)	24	Cocos+	+	-	+	-	-	+	negativo	<i>Staphylococcus</i> sp. (SCN)
