

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, GENOTÍPICO E
FENOTÍPICO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*
PRODUTORAS DE BIOFILMES ISOLADAS
DO AMBIENTE DE ORDENHA
E DE CASOS DE MASTITE BOVINA**

Poliana de Castro Melo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DE
ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* PRODUTORAS DE
BIOFILMES ISOLADAS DO AMBIENTE DE ORDENHA
E DE CASOS DE MASTITE BOVINA**

Poliana de Castro Melo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Setembro – 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

POLIANA DE CASTRO MELO – nascida em Uberlândia – Minas Gerais, em 20 de abril de 1981, é Médica Veterinária, formada em Julho de 2004, pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG. Durante a graduação fez estágios em diversas áreas, e o estágio supervisionado na área de Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de Botucatu. Foi representante de turma durante três anos e meio, participou do diretório acadêmico como membro efetivo e de projetos de iniciação científica na área de Microbiologia e projetos de extensão. Fez estágio na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Câmpus de Jaboticabal-SP após o término da graduação. Em março de 2006 ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, onde desenvolveu o projeto de pesquisa como bolsista do CNPq, e auxílio financeiro de pesquisa da FAPESP, além de outros trabalhos na mesma área. Em setembro de 2005 iniciou o curso de Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite e Ovos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) com o término do mesmo em setembro de 2006. Em outubro de 2007 foi selecionada para o Curso de Doutorado na mesma área e instituição que realiza o Mestrado.

MENSAGEM

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um 'não'.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? "Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

Fernando Pessoa, Lisboa, 1935

DEDICATÓRIAS

*Dedico este trabalho a minha família
em especial aos meus pais,
e minha mãe Nilza, que
sempre me apoiou em todos
os momentos.*

*Dedico também ao meu noivo Rafael,
que está me acompanhando
e me acompanhou todos os dias,
inclusive no laboratório,
após as colheitas do experimento,
nas horas tardes da noite.*

*Ao meu Vô Geraldo pelas suas orações,
Pois tenho certeza que rezou todos os dias
Para que todos os meus objetivos se concretizassem.*

*Dedico especialmente aos queridos cães Danger e Doly
Que já não se encontram mais no meio de nós,
A saudade é muito grande, mas as alegrias deixadas
foram maiores.*

*A minha linda cadela "Maia",
que veio de novo trazer
à alegria a nossa casa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, que está na presente na minha vida em todos os momentos, principalmente nas dificuldades, no medo, na ansiedade, nas alegrias e comemorações, nas dores e nas tristezas, em nenhum momento posso deixar de agradecer o quanto fui abençoada por ti. “ E ainda se vier noites traiçoeiras e a cruz pesada for, Cristo estará contigo, o mundo pode até fazer você chorar, mas Deus te quer sorrindo”.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Nader Filho, por acreditar e confiar em mim, nas minhas idéias e ideais e por todos os momentos de incentivo e apoio.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo, que também quando possível colaborou bastante, principalmente no início do meu trabalho quando me aceitou em seu laboratório para isolar e identificar os estafilococos e também por aceitar ser meu co-orientador.

A minha família, meus pais, Luiz e Nilza, meu irmão Rodrigo e minha cunhada Polly, meu avô Geraldo, meu noivo Rafael e por todos aqueles que nunca deixaram de estar ao meu lado.

A Profa. Dra. Rosário Oliveira, por ter me dado a oportunidade de conhecer não só outro país como a conhecer pessoas, lugares, descobrir e ter novas idéias e também pelo seu carinho e acolhimento, pelas palavras doces, não caberia aqui minha eterna gratidão pelos momentos tão importantes que pude passar em Portugal.

As Professoras Dra Joana, Dra Mariana, Dra Pilar e Dra Maria Olívia, pelos ensinamentos e também pelo carinho ao me receberem na Universidade do Minho.

Ao Sr. Edson Angoti, proprietário da Fazenda Ribeirão das Furnas onde foi realizado meu experimento, obrigada por tudo, não só por disponibilizar sua propriedade como também pelo amigo que se tornou. Tenho saudades de ver o por do sol, comer pastel no posto depois de um dia de trabalho e visitar as cachoeiras maravilhosas de sua propriedade.

Aos queridos amigos e colegas da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) e Laboratório de Microbiologia, aos técnicos Claudete e Ricardo, as Professoras Denise e Rose, aos amigos, Dayanes, Deivid, Laura, Elias, Sabrina, e tantos outros pela amizade, pela ajuda, e por todos os momentos juntos, Meu Muito Obrigada!

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro tanto para a realização da pesquisa quanto para me manter durante o doutorado. Obrigada pela bolsa e pelo auxílio pesquisa. Sem essa ajuda não teria sido possível realizar esse projeto.

A Camila Chioda de Almeida, obrigada pela sua ajuda imprescindível em todos os momentos desde que chegou ao nosso laboratório. Você fez parte não só do meu experimento como da minha história. A amiga Viviane de Souza por todos os momentos no laboratório e nas viagens de congresso, Obrigada pelas alegrias, risos e pela sua amizade.

Ao professor Dr. Antonio Sérgio Ferrauda pela imprescindível ajuda nas análises multivariadas e também pelos conselhos de vida e sua amizade, meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr Manoel Victor Franco Lemos pela disposição em ajudar, por nos emprestar um cantinho quando necessário em seu laboratório e pela colaboração nas correções da qualificação.

Aos professores da banca de qualificação, foram eles: Luciano, Glorinha, Manoel Victor e Amaral pela ajuda e colaboração nas correções e sugestões para a discussão, pois foram imprescindíveis para este trabalho final.

Aos professores do Depto da Med.Vet. Preventiva e Reprodução Animal, Prof Duri, Prof Amaral, Profa Ângela, Profa Adolorata, Prof Mathias, Prof Samir, Profa Glorinha, Prof Adjair, quero agradecer não só pelos conhecimentos transmitidos, mas pelos amigos que se tornaram nestes cinco anos de convivência, muito obrigada.

Aos Técnicos Lila e Diba do Depto MVPRA, muito obrigada pela amizade desde o mestrado e por estarem sempre prontos a ajudar e dispostos todos os dias. Aos funcionários, Roseane, Mariza, Cidinha, Andréia, Assis e Zé também pela colaboração e até mesma pelas conversas nos momentos do café.

A técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, Cláudia Aparecida, pela ajuda, ensino, pelo carinho e pelas lindas imagens que com muita paciência foram geradas, mesmo com toda dificuldade devido a microscópio foi possível terminar este trabalho, meu Muito Obrigada Claudinha.

A amiga Raphaella B. M. Bartoli pela amizade desde o mestrado, pelos convites de aulas e palestras e pelo apoio e palavras amigas sempre que precisei.

Aos amigos do GOU (Grupo de Oração Universitário): Leandro, Gilson, Karla, Edna, Liziane, Érica, Bruno, e a muitos que passaram também pelo grupo. Vocês foram fundamentais, em especial, naqueles momentos de stress e agitação da

Universidade, estavam sempre ali com uma palavra de conforto e tranquilidade. A Unesp não seria a mesma sem vocês.

As amigas da LAFs (Liga Feminina de Schoenstatt), Vera, Mirela, Priscila, Adriana, Diana, Edna, Taísa, Andreza...obrigada por existirem e me apresentarem um pouquinho de um mundo tão lindo. Aos amigos da Igreja Santa Tereza, aos padres Gú e Marcelo e ao Padre Paulo, Leandro e Emerson, por tantas palavras de sabedoria, por momentos maravilhosos em Deus.

A amiga Aracelle Alves, foram muitos momentos de nossa amizade que não dá para relatar e sim só agradecer.

Aos amigos da Unesp e Preventiva: Natália Nespoli, Suzy S. dos Santos, Maria Izabel M Medeiros, Fernanda Rezende, Fernanda Magajeviski, Luciano M Ferreira, Bruna Alexandrino, Juliana Baldin, Lívia, Ju Rossi, Najara, Michelle Brich, Lucimara (Pinga), Zé Roberto, Gian, Felipe, Sandra Conde (Sandrinha), Talita, Jean, Daniele Pereira e Daniely Sales, Profa. Imaculada, Dedinho, e tantos outros obrigada pela amizade e pelos bons momentos juntos.

As amigas de república: Paula, Maristela, Renata, Uly, Pollyanna, Cristinas, Roberta, pelos anos de convivência e por compartilharem comigo todos os dias os momentos de alegria e também o ombro amigo nos momentos de tristeza e dor.

Aos colegas de laboratório da Uminho: Júnia, Douglas, Melyssa, Alê e Vavá, brasileiros que também estavam na busca de algo novo e importante para suas vidas, obrigado por tudo quando mais precisei, da amizade de vocês.

Aos colegas da Uminho, Luís, Sônia, Carina, Daniela, Lucinda, Carla, Cláudia Botelho, Cláudia Sousa, Laura, Hugo, Sana, Priscila, Antônio, Esra, João, Diana, e muitos outros por me receberem tão bem em seu país, e pela ajuda não só laboratorial como também pessoal, pelos momentos divertidíssimos que passamos juntos. Muito Obrigada por tudo!!

A amiga Lúcia da Uminho pelo carinho e colaboração neste experimento, meu muito obrigada pela sua disposição e pela ajuda em solicitar a propriedade leiteira os excrementos para os ensaios com os fagos. Obrigada também por estar no aeroporto na minha chegada me recepcionando e por me apresentar os "Jesuítas", ainda que por pouco tempo estivemos juntas mais só tenho que agradecer.

A Colegas Michele e Daliana, brasileiras que conheci na Uminho e as colegas Ana e Raquel, portuguesas que estavam sempre com ombro amigo para ajudar em todos os momentos. Aos amigos de Uberlândia, em especial as amigas, Lívia e Cláudia pelo carinho e amizade, sem vocês não seria tão forte para buscar meus ideais.

SUMÁRIO	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Obtenção das amostras de leite.....	24
4.1.2 Características da propriedade rural e do rebanho.....	24
4.1.2.1 Alimentação do rebanho.....	25
4.1.3 Seleção dos animais.....	25
4.1.4. Colheita das amostras.....	26
4.1.4.1 Amostras de leite dos quartos mamários para o isolamento bacteriológico.....	26
4.1.4.2 Amostras dos insufladores, mangueiras, tanque de equilíbrio, saída do tanque de equilíbrio e superfície do tanque de expansão.....	26
4.1.4.3 Amostras das mãos dos funcionários.....	27
4.1.4.4 Amostras de leite do tanque de expansão.....	27
4.2 Exames Laboratoriais.....	27
4.2.1 Teste da Catalase.....	28

4.2.2 Teste da Coagulase Livre em Tubo.....	28
4.2.3 Teste de Voges-Proskauer.....	29
4.2.4 Teste de Fermentação da Maltose e Trealose.....	29
4.3 Extração do DNA.....	29
4.4 Amplificação de fragmento de DNA cromossomal para identificação de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.5 Teste do Ágar Vermelho Congo.....	31
4.6 Produção de biofilmes “in vitro”.....	32
4.7 Caracterização Genotípica	
Análise do DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes envolvidos na formação de biofilmes: <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> , <i>agrA</i> , <i>agrB</i> , <i>agrC</i> , <i>agrD</i> , <i>hdi</i> , <i>sar</i> , <i>hla</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> e <i>tsst-1</i>	32
4.7.1 Operon <i>ica</i>	32
4.7.2 Operon <i>bap</i>	33
4.7.3 Operon <i>agr</i>	33
4.7.4 Operon <i>sar</i> e <i>hla</i>	33
4.7.5 Operon <i>clfAB</i>	34
4.7.6 Operon <i>tsst</i>	34
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
4.8.1 Preparação dos cupons de aço.....	35
4.8.2 Preparação da suspensão bacteriana para formação de biofilme em cupons de aço.....	36
4.8.3 Preparação das borrachas dos insufladores e da tampa do tanque de equilíbrio.....	36
4.8.4 Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
4.9 Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE).....	37
4.9.1 Classificação dos Pulsotipos.....	39
4.10 Teste de sensibilidade das estirpes de <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos.....	39

4.11 Antibiograma para estirpes de <i>S. aureus</i> em biofilmes formadas em microplacas com 96 poços em fundo “U”	40
4.12 Estirpes utilizadas.....	41
4.12.1 Teste da Adesão Estática e Utilização do Hipoclorito de Sódio.....	41
4.12.2 Formação dos Biofilmes em Placas e Utilização do Hipoclorito de Sódio..	42
4.12.3 Contagem Padrão em Placas Para Bactérias Aderidas e Não Aderidas...	42
4.12.4 Teste do Cristal Violeta (Microplacas).....	43
4.12.5 Coloração de DAPI e Visualização da Eficiência do Hipoclorito de Sódio no Microscópio de Fluorescência.....	43
4.12.6 Isolamento de Pró-fagos.....	44
4.12.7 Propagação e Confirmação dos Fagos.....	45
4.12.8 Isolamento de Bacteriófagos.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES	110
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	113
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
APÊNDICE.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na pesquisa...	35
Tabela 2. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> de acordo com o sítio de localização no ambiente de ordenha, leite de vacas e leite do tanque de expansão, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009...	51
Tabela 3. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com o sítio de localização no ambiente de ordenha, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	52
Tabela 4. Resultado da avaliação da habilidade da produção de biofilmes no Agar Vermelho Congo (CRA) por estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	58
Tabela 5. Resultado da avaliação da habilidade da produção de biofilmes no Teste de Microplacas (Mtp) por estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundas de leite e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	59
Tabela 6a. Distribuição de 39 pulsotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite de vacas com mastite bovina, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008 /2009.....	75
Tabela 6b. Distribuição de 31 pulsotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite de vacas com mastite bovina, leite do tanque de expansão e ambiente de ordenha em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	76

Tabela 7a. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> com respectivos sítios de isolamento de acordo com as datas de obtenção, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008 /2009.....	77
Tabela 7b. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> com respectivos sítios de isolamento de acordo com as datas de obtenção, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008 /2009.....	78
Tabela 8a. Distribuição de 22 pulsotipos quanto a resistência a quatro antimicrobianos e seis genes relacionados com a produção de biofilmes.....	80
Tabela 8b. Distribuição de 23 pulsotipos quanto a resistência a quatro antimicrobianos e seis genes relacionados com a produção de biofilmes.....	81
Tabela 9. Resultados dos antibiogramas, pelo teste de difusão em disco, de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de amostras de leite de vacas com mastite, do leite do tanque de expansão e do ambiente de ordenha, em propriedade leiteira na região de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	91
Tabela 10. Contagem de unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> em biofilmes “ <i>in vitro</i> ” isolados de leite de vacas com mastite subclínica, leite de tanque de expansão e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	92
Tabela 11. Contagem das unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> , sensíveis a seis antimicrobianos no teste de difusão em disco, após produção de biofilmes e serem submetidas a 6 horas de tratamento com 6 antimicrobianos diferentes na concentração de 100mg/L.....	93

Tabela 12. Contagem das unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de <i>S. aureus</i> , sensíveis a seis antimicrobianos no teste de difusão em disco, após produção de biofilmes e serem submetidas a 6 horas de tratamento com 6 antimicrobianos diferentes na concentração de 500mg/L.	94
Tabela 13 - Medidas de luz (URL) emitidas pelo teste de ATP-bioluminescência antes e após a utilização de seis antimicrobianos na concentração de 100mg/L, em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Tabela 14 - Medidas de luz (URL) emitidas pelo teste de ATP-bioluminescência antes e após a utilização de seis antimicrobianos na concentração de 500mg/L, em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	96
Tabela 15 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> em adesão estática e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 150ppm em quatro tempos diferentes.....	101
Tabela 16 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> em Biofilmes e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 150ppm em quatro tempos diferentes.....	102
Tabela 17 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> em Biofilmes e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 300ppm em quatro tempos diferentes.....	103
Tabela 18 – Produção de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite subclínica bovina e ambiente de ordenha, antes e após exposição ao Hipoclorito de Sódio (150ppm), em quatro tempos diferentes.....	104

Tabela 19 – Produção de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite subclínica bovina e ambiente de ordenha, antes e após exposição ao Hipoclorito de Sódio (300ppm), em quatro tempos diferentes.....	105
---	-----

Tabela 20 – Isolamento de bacteriófagos de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	109
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de formação de biofilme em catéter por <i>S. epidermidis</i>	7
Figura 2. Algumas propostas que podem estar associadas com mecanismo de resistência bacteriana nos biofilme.....	12
Figura 3. Genes envolvidos no processo de formação de biofilmes.....	16
Figura 4. Reação de detecção de ATP por bioluminescência.....	19
Figura 5. Eletroforograma do produto de PCR do gene <i>sa442</i> , DNA genômico de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 108pb.....	53
Gráfico 1 – Análise Genotípica quanto a Presença dos Genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> , <i>agr</i> , <i>hdl</i> , <i>hla</i> , <i>clafA</i> , <i>clafB</i> , <i>tsst-1</i> e <i>sarA</i> de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados do leite e do ambiente de ordenha de propriedade leiteira no Município de Indianópolis-MG, 2008/2009.....	60

Prancha 1

Figura 6: Eletroforograma do produto de PCR do gene *icaA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1315pb. PM: peso molecular..... 64

Figura 7: Eletroforograma do produto de PCR do gene *icaD*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 381pb. PM: peso molecular..... 64

Figura 8: Eletroforograma do produto de PCR do gene *bap*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 971pb. PM: peso molecular..... 64

Figura 9: Eletroforograma do produto de PCR do gene *sarA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 275pb. PM: peso molecular..... 64

Figura 10: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 610pb. PM: peso molecular..... 64

Figura 11: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrC*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1223pb. PM: peso molecular..... 64

Prancha 2

Figura 12: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrBD, hdl*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1087pb. PM: peso molecular..... 65

Figura 13: Eletroforograma do produto de PCR do gene *clfA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 292pb. PM: peso molecular..... 65

Figura 14: Eletroforograma do produto de PCR do gene *clfB*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 205pb. PM: peso molecular..... 65

Figura 15: Eletroforograma do produto de PCR do gene *tsst-1*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 350pb. PM: peso molecular..... 65

Prancha 3

Figura 16. Biofilme formado em cupons de aço por *Staphylococcus aureus* isolados de insufladores..... 66

Prancha 4

Figura 17. Biofilme de *Staphylococcus aureus* oriundos de mangueiras condutoras de leite visualizado por MEV em cupons de aço..... 67

Prancha 5

Figura 18. Biofilme de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica visualizados em cupons de aço por MEV..... 68

Prancha 6

Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura realizada em borracha de silicone que era utilizada na tampa do tanque de equilíbrio do leite na sala de ordenha, demonstrando a formação de biofilme misto com a presença de bacilos, cocos e hifas..... 69

Prancha 7

Figura 20. Borrachas de látex dos conjuntos de insufladores utilizadas por um período de 3 meses demonstrando o desgaste e a presença de fissuras com depósitos de resíduos de leite.....	70
Figura 21: Exemplos de padrões de restrição do DNA genômico das estirpes de 51 a 61 de <i>Staphylococcus aureus</i> , submetidas à PFGE. PM: Peso molecular.....	72
Figura 22. Dendrograma de 45 pulsotipos agrupados com seis tipos de genes e quatro tipos de antimicrobianos.....	85
Figura 23. Imagens geradas por microscopia de fluorescência demonstrando a redução de células de <i>Staphylococcus aureus</i> aderidas por duas horas a cupons de poliestireno após o uso do hipoclorito de sódio a 150ppm nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos. Acima da direita para a esquerda, <i>Staphylococcus aureus</i> aderidos a cupons de poliestireno, e cupons após 5, 10, 20 e 30 minutos de tratamento, respectivamente.....	106

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DE ESTIRPES DE
Staphylococcus aureus PRODUTORAS DE BIOFILMES ISOLADAS DO
AMBIENTE DE ORDENHA E DE CASOS DE MASTITE BOVINA**

RESUMO

A prevalência da mastite por *Staphylococcus aureus* em rebanhos leiteiros ocorre devido à sua alta infectividade associada a fatores de virulência que conferem ao microrganismo a capacidade de se instalar no parênquima mamário. Sendo assim o objetivo da presente pesquisa foi avaliar as características fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas das estirpes de *S. aureus* oriundas de leite de vacas com mastite bovina, leite do tanque de expansão, insufladores, mangueiras condutoras de leite, borracha do vácuo, borracha da tampa do tanque de equilíbrio, saída do tanque de equilíbrio, superfície do tanque de expansão e mãos de ordenhadores, em uma propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, no período de Agosto de 2008 a Setembro de 2009. Para tanto foram utilizados os seguintes testes: *California Mastitis Test*, isolamento microbiológico, provas bioquímicas, extração de DNA, reação em cadeia da polimerase, teste de microplacas, teste do Ágar vermelho congo, microscopia eletrônica de varredura, eletroforese de campo pulsado, teste de sensibilidade aos antimicrobianos, contagem de unidades formadores de colônias, ATP-bioluminescência, eficiência do hipoclorito de sódio e isolamento de pró-fagos e fagos. Os resultados revelaram 440 estirpes de *S. aureus* com produção de biofilme visualizados nos testes fenotípicos e na microscopia de varredura sendo *hla*, *clfab*, *agrA* e *sarA* os genes mais prevalentes. Foram também observados a presença de 70 pulsotipos diferentes, sendo o leite de vacas e insufladores os locais com maior quantidade de pulsotipos. Quanto a resistência bacteriana frente aos antimicrobianos foi observada uma maior resistência da Penicilina (90%), Eritromicina (80%) e Clindamicina (74%). Quando as estirpes de *S. aureus* foram submetidas ao teste

de susceptibilidade para células em biofilmes e os antimicrobianos que demonstraram maior eficiência na concentração de 100mg/L foram a gentamicina e vancomicina. Na concentração de 500mg/L a maior eficiência ocorreu frente a vancomicina e gentamicina respectivamente. Nos testes de avaliação de eficiência do hipoclorito de sódio 150ppm, verificou-se para bactérias não aderidas eficiência para tempos de contato de cinco a trinta minutos. Quando avaliado na concentração de 300ppm de hipoclorito de sódio as bactérias em biofilme foram eliminadas e na concentração de 150ppm houve contagem de colônias no tempo de contato de cinco minutos. Também foi possível isolar seis pró-fagos e quatro fagos com possível espectro lítico.

Palavras-Chaves: adesão bacteriana, polissacarídeos, resistência bacteriana, pulsotipos.

**EPIDEMIOLOGICAL, GENOTYPIC AND PHENOTYPIC STUDY OF STRAINS OF
Staphylococcus aureus PRODUCERS OF BIOFILM ISOLATED FROM THE
MILKING ENVIRONMENT AND FROM CASES OF BOVINE MASTITIS**

ABSTRACT

The prevalence of *Staphylococcus aureus* on dairy herds occur due to the high infectivity associated with virulence factors that give the organism the ability to install on the mammary gland, forming microabscesses. Therefore the objective of this study was to evaluate the phenotypic, genotypic and epidemiological strains of *S. aureus* derived from milk of cows with mastitis, milk tank, foamed milk conductive hoses, vacuum rubber, rubber tank cap balance, leaving the balance tank, the surface of the expansion tank and hands of milk manipulators on a dairy property in the city of Indianapolis-MG in the period August 2008 to September 2009. According to this, the following tests were used: *California Mastitis Test*,

microbiological isolation, biochemical tests, DNA extraction, polymerase chain reaction test, microplate test, Congo red Agar test, scanning electron microscopy, pulsed-field electrophoresis, test antimicrobial susceptibility, counting colony forming units, ATP-bioluminescence, efficiency of sodium hypochlorite and isolation of pro-phages and phages. The results revealed 440 strains of *S. aureus* to produce biofilm showed in phenotypic tests and scanning electron microscopy and *hla*, *clfAB*, *agrA* and *hly* the most prevalent genes. It was also observed the presence of 70 different pulsotypes, and the milk of cows and blowers sites with higher amounts of pulsotypes. The bacterial resistance to antimicrobials was observed as increased resistance of penicillin (90%), erythromycin (80%) and clindamycin (74%). When the strains of *S. aureus* were tested with cell susceptibility to antimicrobials in biofilms it showed the highest efficiency at a concentration of 100mg / L were gentamicin and vancomycin. Concentration of 500mg / L to greater efficiency occurred against vancomycin and gentamicin respectively. In tests to assess efficiency of sodium hypochlorite 150 ppm, verified for planktonic cells, the efficient in contact time in five to thirty minutes. It was verified that the bacteria not adhered to efficiency and contact time of five to thirty minutes. When measured at a concentration of 300 ppm sodium hypochlorite in biofilm bacteria were removed and the concentration of 150ppm was counting colonies in contact time of five minutes. It was also possible to isolate six and four pro-phages phages with lytic possible spectrum.

Key Words: bacterial adhesion, polysaccharides, bacterial resistance,

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do leite tem obtido destacada importância sob o olhar da Saúde Pública, embora, no Brasil existam poucos ou até mesmo a subnotificação dos relatos de casos de intoxicações oriundos do leite e derivados, sendo assim frequentes os casos de doenças associadas ao seu consumo. Um dos fatores que contribui para estes dados é o mercado informal que no ano de 1999 estava em torno de 40% dos produtos de leite e derivados (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999).

A mastite bovina é uma doença importante para produção leiteira, resultante da falência de uma complexa relação entre três fatores: resistência do hospedeiro, agente e meio ambiente (CARNEIRO et al. 2009)

A mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus* causa perdas econômicas substanciais na indústria leiteira. Do ponto de vista epidemiológico é importante determinar a origem dos micro-organismos envolvidos na etiologia da doença, permitindo melhor monitoramento da doença no rebanho, tratamento dos animais doentes e também a adoção de medidas de prevenção (LANGE et al. 1999).

Staphylococcus aureus se destacam como agentes de maior prevalência e de tratamento mais difícil, devido a um aumento de resistência aos antimicrobianos. Na década de 90, em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais identificou-se a presença destes patógenos em 50% das mastites (BRABES et al. 1999).

Os *S. aureus* são conhecidos como micro-organismos mesófilos, porém podem-se multiplicar em temperaturas de 7°C a 47°C (JAY et al. 1994). A contaminação microbiana do leite pode ocorrer de duas formas principais: por meio da incorporação de micro-organismos que estão no úbere ou por meio da contaminação por contato com utensílios, e equipamentos de ordenha contaminados durante o processo da ordenha (FONSECA & SANTOS, 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

O diagnóstico dos *S. aureus* no leite pode ser realizado por meio de testes bioquímicos e técnicas moleculares, estas muito utilizadas, principalmente para identificar genes de virulência e também para separar estirpes e clones diferentes.

A técnica da PCR quando associada a ribotipagem tem sido muito útil para esta finalidade devida a alta sensibilidade e rapidez, o que possibilita um melhor monitoramento destes micro-organismos e o estudo dos clones existentes (PEREIRA et al. 2002).

Diante do exposto torna-se cada vez mais necessário controlar as infecções mamárias, evitando assim a contaminação direta do leite e a persistência do patógeno no ambiente de ordenha, que entra em contato com o leite e causa prejuízos ao produtor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária pode ser classificada em duas formas: clínica e subclínica. A mastite subclínica bovina apresenta prevalência muito maior que a forma clínica e caracteriza-se por apresentar alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e na concentração dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (FONSECA & SANTOS, 2000).

A preocupação com a mastite bovina se justifica, pois se estima no rebanho brasileiro a prevalência de 20 a 38% desta doença o que representaria perda da produção entre 12 a 15%, sendo assim a causa de perda econômica mais significativa na indústria leiteira. Devem ser computados gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro dos animais e a diminuição do valor comercial dos animais (REIS et al. 2005).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação de alteração no leite utilizando a caneca de fundo escuro e presença de sinais da inflamação como dor, edema no úbere e redução na secreção do leite. No entanto, o diagnóstico da mastite subclínica somente pode ser realizado através de métodos auxiliares, dentre os quais destacam-se aqueles que evidenciam o aumento da Contagem de Células Somáticas, devido ao influxo de leucócitos, uma vez que o leite está aparentemente normal.

O método comercial auxiliar mais utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica é o “California Mastitis Test” (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957), que tem por objetivo avaliar o conteúdo celular do leite. As principais vantagens atribuídas a este método são representadas pela elevada concordância com o exame bacteriológico, pelo pequeno número de resultados falso-negativos, pelo baixo custo e pela facilidade de aplicação e praticidade. (FAGLIARI et al. 1990; BRITO et al. 2002).

A interpretação do CMT baseia-se na observação visual da mistura do leite com o reagente. A reação se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas. O grau de positividade pode variar desde uma até três cruzes, em função da intensidade da massa viscosa formada. Por outro lado, os resultados negativos são representados pela ausência desta massa viscosa (SCHALM & NOORLANDER, 1957).

Dentre os vários agentes causadores de mastite assumem destaque o gênero *Staphylococcus* sp, os quais são classificados como cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não fotossintético, não esporulado, catalase-positivos e capazes de multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São micro-organismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48° C, com ótima de 37° C e pH na faixa de 4,0 a 10,0, com ótimo de 6,0 a 7,0. (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

No gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* sempre foi a espécie mais importante relacionada com uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais. Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sinais clínicos e gravidade das infecções causadas por *S. aureus* (BANNERMAN, 2003).

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo. Além disso, o *S. aureus* é capaz de produzir mais de uma enterotoxina simultaneamente. A produção simultânea de diferentes tipos de toxinas pode aumentar os seus efeitos toxigênicos isolados, sugerindo que essa co-produção possa desempenhar papel importante na

patogenia das infecções intramamárias produzidas por esses micro-organismos (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas (EES) são proteínas solúveis em água, monoméricas, globulares, com peso molecular entre 26.000 e 29.000 daltons, ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, com duas cisteínas formando ponte de dissulfeto (BERGDOL, 1989). Apresentam-se relativamente resistentes ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, renina e papaína o que permite sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda da atividade (HUI, 1994). Estudos realizados por esses autores demonstraram que a enterotoxina C (EEC) é a mais termoestável das enterotoxinas, seguidas pelas enterotoxinas B e A (EEB e EEA). Segundo Baird-Parker (1990), para a inativação da toxina, seriam necessários de três a oito minutos a 121°C.

De acordo com Akineden et al. (2001), as estirpes de *S. aureus* patogênicos podem produzir enterotoxinas (SEs) dos tipos A à E e G à J, toxinas esfoliativas dos tipos A e B (ETA, ETB) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que são responsáveis por causar, em humanos, intoxicações alimentares, alergias e até mesmo desordens multi-sistêmicas que podem levar à morte.

O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *Staphylococcus* de origem animal foi feito por Jones & Wieneke (1986). Estudos realizados com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstraram que entre 20% e 77% dos isolados produziram TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas (ICHIKAWA et al. 1996). Em tanques de expansão, utilizados para resfriamento e armazenamento de leite, 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas demonstraram capacidade de produzir essas toxinas (TAKEUCHI et al. 1998). Pesquisas realizadas com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstraram que 43% dos isolados produziram TSST-1 (CARDOSO et al. 2000).

Em ambientes naturais as bactérias estão presentes sob duas formas, a forma planctônica (livre) e séssil. A forma séssil é importante para garantir a persistência dos micro-organismos no ambiente. Dentro de praticamente todos os ecossistemas os microorganismos multiplicam-se em comunidades estruturadas chamados biofilme (COSTERTON et al. 1999).

2.1 Biofilmes

Os biofilmes são constituídos de bactérias, as quais estão aderidas a qualquer superfície, que por sua vez são envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, ou seja, são depósitos onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON et al. 1999).

A matriz do biofilme é sintetizada por polimerases, constituindo-se em uma estrutura composta de diversas fibras de polissacarídeo ou proteínas globulares, e em seu estado hidratado contém cerca de 98% a 99% de água, protegendo as células da desidratação, já que podem reter água em quantidades muito maiores que sua massa e se desidratam lentamente (FIGUEIREDO, 2000).

Em ambientes naturais, as células microbianas necessitam adaptar-se a alterações no meio vizinho enquanto que as células dentro dos biofilmes não necessitam desta adaptação, pois as matrizes dos biofilmes proporcionam a troca de nutrientes orgânicos (MARQUES, 2005).

A adesão superficial dos micro-organismos forma o glicocálice, que sobrevive a ambientes hostis, de modo a bloquear e reter os nutrientes necessários para a multiplicação dos biofilmes, além de oferecer proteção às células planctônicas contra agentes antimicrobianos (TORTORA et al. 2000).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, debaixo das quais os micro-organismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros micro-organismos. Sendo assim, nos biofilmes os micro-organismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos utilizados nos procedimentos de higienização (RICHARD et al. 2003; MARQUES, 2005).

A água é o principal componente dos biofilmes, tornando-o hidrofílico (HOIBY et al. 2001). Os canais abertos de água circulam entre as estruturas nos biofilmes

permitindo a aquisição e troca de genes por transferência horizontal (WUERTZ et al. 2004).

Algumas evidências sugerem que tipos de *S. aureus* que colonizam regiões extramamárias (fômites), não são os mesmos que causam infecção intramamária. Devido ao grande potencial de produção de exopolissacarídeo como fator de virulência para infecção intramamária, hipotetizou-se que os *S. aureus* que causam infecção intramamária tem maior habilidade de produzir biofilmes do que isolados de fontes extramamárias (FOX et al. 2005).

Uma das hipóteses mais convincentes para explicar a resistência à terapia é a habilidade dos estafilococos e outros micro-organismos se multiplicarem e formarem biofilmes em tecidos infectados, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos (MELCHIOR et al. 2005).

A resposta à invasão dos micro-organismos tem como objetivo proteger o hospedeiro da infecção. No entanto em casos de infecções crônicas esta resposta pode levar a danos devido a prolongada produção de citocinas por células do sistema imune resultando em uma resposta inflamatória exagerada e aumento do nível de proteases na lesão que degrada tecido do hospedeiro, assim como as bactérias. As bactérias também podem utilizar do sistema imunológico para driblar a infecção, como exemplo os *S. aureus* sobrevivem nos neutrófilos e utilizam a resposta imune como mecanismo de virulência (GRESHAM et al. 2000)

MCLAUGHLIN & HOOGEWERF (2006) realizaram estudos objetivando identificar a resposta dos biofilmes às citocinas e verificaram que os micro-organismos em biofilme responderam à 61% a presença das citocinas enquanto que os micro-organismos na forma livre (não em biofilme) responderam apenas à 11% a presença das citocinas e então concluíram que os micro-organismos em biofilmes respondem rapidamente as defesas quando na presença da resposta inflamatória.

A hipótese que infecções mamárias são associadas com a formação de biofilmes é também realçada pela falha na sensibilidade aos antimicrobianos. Em uma célula primária epitelial mamária os testes para sensibilidade de neomicina, neomicina com penicilina, neomicina com tetraciclina, neomicina com bacitracina, e tetraciclina com

bacitracina foram mais sensíveis para células não aderentes de *S. aureus* que para células aderentes (HENSEN, 2000).

2.1.2 Mecanismos de adesão e interação dos biofilmes nas superfícies

O processo de adesão bacteriana a superfície pode ser descrita como um processo de duas etapas, uma fase inicial, instantânea e reversível (física) e uma fase dependente, irreversível ao nível molecular e celular que foi primeiramente proposta por Marshall e colaboradores, em 1971, e aceita pela maioria dos pesquisadores (MARQUES, 2005)

Uma segunda teoria sugere a existência de cinco etapas diferenciadas que podem ser citadas na seguinte ordem: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; processo de adesão bacteriana por atração eletrostática, ainda reversível; multiplicação celular e colonização e adesão irreversível. (DUDDRIDGE & PRITCHARD, 1983 citado por MARQUES, 2005).

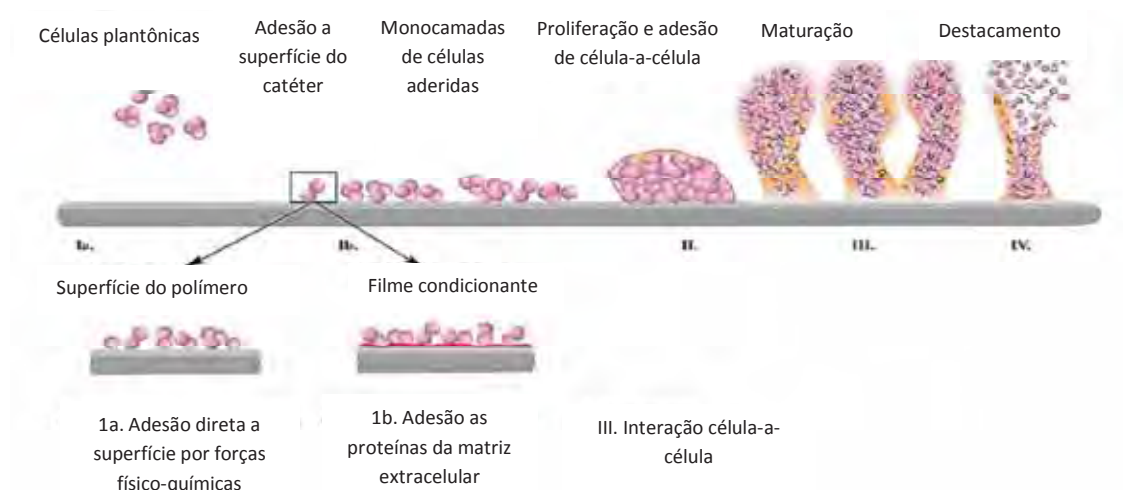


Figura 1: Modelo de formação de biofilme em catéter por *S. epidermidis*. A formação de biofilmes é demonstrada aqui em quatro etapas: adesão, proliferação, amadurecimento e destacamento de células. Retirado da Fonte: <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1295/figures.htm>.

Quando as distâncias de separação entre as células bacterianas e as superfícies a serem colonizadas forem maiores que 50nm somente as forças atrativas de Van der Waals atuam na adesão das bactérias aos substratos. Essa distância é relativamente grande para a oposição de forças e o reconhecimento de componentes específicos de superfície. A uma distância de 10 e 20nm, ocorrem interações em virtude da repulsão eletrostática, força que se opõe às forças de Van der Waals. Nessa etapa a adesão pode ser reversível, porém altera-se com o tempo para pouco reversível ou essencialmente irreversível, em razão do rearranjo da superfície da célula, o que leva as interações de curta distância. Para isso, o filme de água precisa ser removido da interface superfície/bactéria, pois o maior papel da hidrofobicidade e dos componentes de superfície hidrofóbica na adesão bacteriana, provavelmente, é em razão do efeito desidratante nesse filme de água, o que possibilita a ocorrência de interações específicas de curta distância (FIGURA 1).

A uma distância menor que 1,5nm, em que a barreira de energia potencial já foi superada, interações específicas podem ocorrer. Estas interações são ligações microscópicas, como exemplo a interação entre um componente da superfície da célula e o substrato a uma distância extremamente curta através de ligações iônicas, pontes de hidrogênio e outras ligações químicas. A interação não-específica é definida como aquela que ocorre em virtude da propriedade de superfície microscópica total, tais como as cargas ou a energia livre de superfície, sendo que essas interações podem atuar à consideráveis distâncias do substrato (BUSSCHER & WEERKAMP, 1987).

Foi proposto recentemente um valor calculado com base na força de Van der Waals, em que uma longa distância seria $> 50\text{nm}$, enquanto que a curta seria menor que 1,5nm (MARQUES, 2005).

Após o contato inicial com a superfície, os micro-organismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando a formação das matrizes dos biofilmes, e dentro das matrizes, outras substâncias orgânicas e inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com micro-organismos. A produção de exopolissacarídeo (EPS) aumenta com as adesões das bactérias às superfícies e caso as células dos biofilmes

sejam reinoculadas no meio como células planctônicas, haverá redução na produção de EPS (KUMAR & ANAND, 1998).

Adesão é uma situação onde as bactérias aderem firmemente a uma superfície por interações físico-químicas completas entre elas, incluindo uma fase inicial de contato físico reversível e uma fase dependente do tempo de adesão celular e química irreversível. Não há energia envolvida na formação de uma junção adesiva entre as bactérias e superfícies. A aderência é uma descrição geral da adesão bacteriana e a fixação pode ser definida como a fase inicial de adesão bacteriana, referindo-se mais para o contato físico do que interações celulares. (FOX et al. 2005).

Outro conceito que deve ser elucidado é o de substrato e “*substratum*”. O substrato é material utilizado pelos micro-organismos como fonte de energia, mas de vez em quando, pode ser utilizado como uma fonte alternativa. “*Substratum*” é uma superfície sólida a qual o micro-organismo pode aderir. (JEFERSON, 2004)

As cápsulas dos micro-organismos são compostas de polissacarídeos e proteínas. Estudos tem sugerido que os polissacarídeos e proteínas atuam como adesinas bacterianas e que cápsulas hidrofílicas ajudam no processo de adesão enquanto que cápsulas hidrofóbicas reduzem a aderência. (GOMES, 2010).

A aderência de patógenos na mastite foi investigada “*in vitro*” e “*in vivo*” (AGUILAR & ITURRALDE, 2001; HENSEN et al. 2000). Exames microscópicos de *S. aureus* em tecido mamário com infecções agudas e crônicas mostraram a permanência das bactérias agrupadas dentro dos alvéolos e ductos lactíferos em associação com células epiteliais e invadidos por tecido intersticial. Estes agrupamentos de bactérias apareceram aproximadamente 24 horas após a exposição via intramamária ao patógeno.

2.1.3 Antimicrobianos e Desinfetantes x Resistência Bacteriana

A resistência dos micro-organismos em biofilmes a substância biocidas é uma realidade que se torna crescente, a cada dia, não só pelos perigos sanitários como também em relação aos gastos e prejuízos nas indústrias alimentícias. Parâmetros

como concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) servem, na maioria das vezes, como referência no tratamento das infecções, porém em biofilmes se torna ineficiente devido às diferenças com os micro-organismos da forma de vida planctônica. A padronização da concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC) tem avançado como forma de relacionar as medições terapêuticas "*in vitro*" e adotá-las no tratamento de doenças bacterianas (CERI et al. 1999).

Estudos "*in vitro*" demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células livres das mesmas estirpes (AMORENA et al. 1999; OLSON et al. 2002; CONLEY et al. 2003). Os mecanismos responsáveis pela resistência dos micro-organismos nos biofilmes aos agentes antimicrobianos são: demora na penetração de agentes antimicrobianos através das matrizes dos biofilmes, taxa de multiplicação alterada de organismos nos biofilmes e mudanças fisiológicas com o multiplicação dos biofilmes incluindo as células persistentes.

Uma baixa taxa de multiplicação das bactérias em testes com antimicrobianos foi relatada (COSTERTON, et al. 1999), e esse fenômeno aconteceu por uma baixa susceptibilidade das bactérias em biofilmes submetidos a agentes antimicrobianos, a qual é exigida para a multiplicação dos micro-organismos, devido ao efeito bactericida dos antimicrobianos. Por exemplo, penicilinas e cefalosporinas praticamente não têm efeito em células que não estão se multiplicando, e o efeito bactericida é proporcional à multiplicação das células bacterianas. Várias classes de antibióticos incluindo aminoglicosídeos e fluorquinolonas, no entanto, podem destruir células em não divisão, mas são mais eficientes em células que se dividem rapidamente.

A penetração de antibióticos e as baixas taxas de replicações bacterianas não explicam inteiramente a resistência dos biofilmes a um dos mais importantes grupos dos agentes antimicrobianos, as fluorquinolonas, compostos esses que atravessaram o biofilme bacteriano e foram capazes de destruir células em não divisão (BROOUN et al. 2000). No entanto, depois de 3-4 horas de multiplicação bacteriana, com uma maior concentração de agentes antimicrobianos não houve aumento do efeito bactericida. Esse experimento mostrou que uma pequena fração de células persistentes podem

permanecer após a administração das fluorquinolonas e sugeriu-se que estas células persistentes eram células que tinham o mecanismo de morte celular inativado (LEWIS, 2000).

As células persistentes foram responsáveis pela sobrevivência das populações bacterianas, e as mudanças fisiológicas adaptativas nas células persistentes foram vistas como a chave para a extraordinária propriedade de sobrevivência dos biofilmes (FIGURA 2), (LEWIS, 2001). As bactérias removidas dos biofilmes foram tão sensíveis quanto às células livres primárias (ANDERL et al. 2003).

Potencialmente, os biofilmes só se formarão em áreas molhadas ou úmidas, mas a presença de nutrientes favorece este fenômeno. Uma vez formados, a limpeza da superfície torna-se difícil pela presença da camada exopolissacarídeo (EPS) que pelos procedimentos de limpeza devem assegurar a remoção eficaz de restos alimentares e outros resíduos que possam fornecer nutrientes e ou conter micro-organismos e fomentar a sua multiplicação (MARQUES, 2005).

Um programa de limpeza eficiente vai além das medidas tradicionais do processo produtivo. Medidas como: a redução da concentração de substâncias orgânicas na corrente líquida, limpeza mecânica freqüente, desenho dos equipamentos corretos, nos quais se busca evitar regiões mortas e de estagnação e utilização de materiais fáceis de limpar entre outros complementam o modelo tradicional. Pode ser também implementado técnicas para monitorização de biofilmes, inspeção visual e observação de sinais de corrosão.

O programa de limpeza e desinfecção tem que ser adaptado a cada estabelecimento em função do tipo de sujeiras e dos equipamentos e prever fatores como a dureza da água, já que esta é o principal agente de limpeza. A água com alto grau de dureza (alta quantidade de sais) dificulta a limpeza (MARQUES, 2005).

Os desinfetantes com maior uso na indústria alimentar são os halogêneos, peroxigênicos, ácidos e compostos quaternários de amônio (QAC), sendo que a sua eficiência é dependente da presença de resíduos, da dureza da água, da temperatura de aplicação e da capacidade para entrar em contato com os micro-organismos sobreviventes (GIBSON et al. 1999).

O cloro é comumente aplicado como biocida devido à sua ação oxidante, possuindo um amplo espectro de atuação e algum efeito esporocida. Podem ser utilizados na forma de diversos compostos agindo na membrana ou afetando o metabolismo celular interno. Pode ser inativado na presença de material orgânico e biofilme, estes reduzem sua ação sendo aconselhável aumentar o tempo de contato para aumentar sua eficiência (MARQUES, 2005).

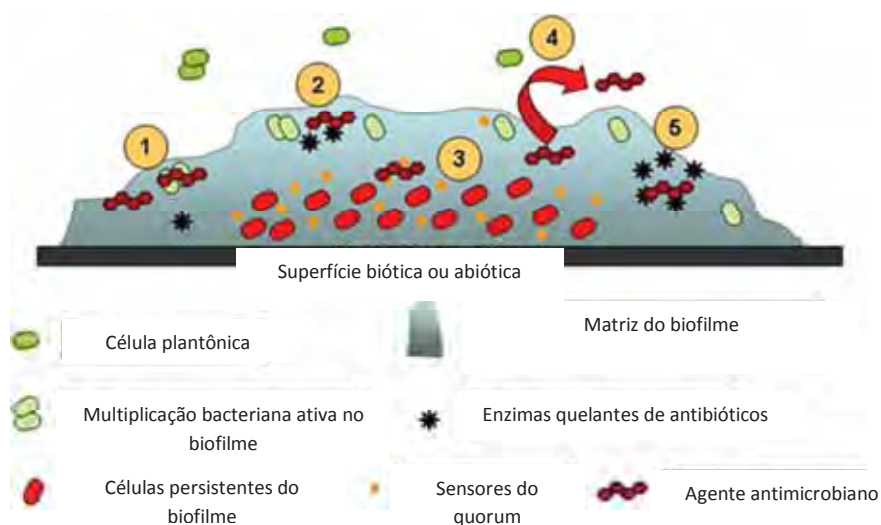


Figura 2: Algumas propostas que possam estar associadas com mecanismos de resistência bacteriana nos biofilmes. (1) Antimicrobianos falham ao penetrar a superfície do biofilme. (2) Antimicrobianos podem ser destruídos por enzimas na matriz do biofilme. (3) Taxa de multiplicação alterada dentro do biofilme (presença de células persistentes). (4) Expressão de genes de resistência específicos para o biofilme. (5) Superexpressão de enzimas quelantes de antimicrobianos (POZO & PATEL, 2007).

2.1.4 Testes fenotípicos e microbiológicos para detectar produção de biofilme

FREEMAN et al. (1989) propuseram o ágar Vermelho Congo, como método alternativo para detectar a produção de *slime* em *Staphylococcus* coagulase negativa. Utilizou o ágar Vermelho Congo e a produção de “slime” foi detectada em 77,78% das

estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Este meio de cultura permite verificar as modificações fenotípicas das colônias dos *Staphylococcus* coagulase-negativa, as quais são categorizadas pelas cores negra e vermelha, sendo que as colônias produtoras de *slime* apresentam cor negra e as não produtoras cor vermelha.

STEPANOVIC et al. (2000) notaram que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos pelos *Staphylococcus* sp, além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos micro-organismos.

JAIN & AGARWAL (2009) estudaram a eficiência dos métodos fenotípicos Ágar Vermelho Congo (CRA) e Teste Microplacas para avaliar o potencial dos *Staphylococcus* sp isolados de suabes de mucosa nasal e cateter venoso de humanos na produção de biofilmes e concluíram que os dois testes apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade para detectar micro-organismos produtores de biofilmes.

Os testes microbiológicos para avaliar a contagem de células em biofilmes são utilizados, principalmente, quando necessita-se avaliar a quantidade de micro-organismos presentes e também para testes com substâncias que atuem nos biofilmes. As dificuldades são em relação à execução do teste, pois para remover os biofilmes das placas de poliestireno e colocá-los nas placas com Ágar para contagem exige cuidado e um bom treino. Mas, quando este teste é bem feito, ele é considerado como padrão ouro em relação a outros testes fenotípicos por relatar número verdadeiro de micro-organismos em biofilme.

2.1.5 Genes envolvidos e ligados ao processo de formação dos biofilmes

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) ou poly-N-succinil- β -1,6-glucosamina, a síntese é codificada pelo gene produto do operon *icaABCD* sendo que os genes e produtos do operon *ica* foram identificados como fundamentais para a formação de biofilmes (O' TOOLE et al. 2000; STANLEY & LAZAZZERA, 2004 citado por MARQUES, 2005) (FIGURA 3).

O polissacarídeo capsular adesina PS/A é responsável pela adesão primária à superfície celular e sua síntese é controlada pelo operon *ica*, em seguida multicamadas de células são formadas devido a produção do polissacarídeo intercelular adesina também controlado pelo operon *icaADBC*. Verificou-se que os genes *icaA* e *icaD* tem importante papel na formação dos biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis* (VASUDEVAN et al. 2003).

MELO, (2008) estudando estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes isoladas de casos de mastite bovina subclínica encontrou em 95,15% dos isolados genes *icaA* e *icaD*, e 98% das estirpes foram produtoras de biofilmes pelo teste de aderência em microplacas sendo este o melhor teste fenotípico para identificação da produção de biofilmes por estirpes de *S. aureus*.

As respostas para algumas das perguntas referentes à regulação gênica dependente de densidade populacional, por meio de relatos de novas pesquisas científicas, começaram a surgir. Mostrou-se que a comunicação intercelular bacteriana é realizada através da produção e liberação no meio externo de pequenas moléculas, chamadas de auto-indutores e, em 1994, esse fenômeno recebeu o nome de *quorum sensing* (do inglês, 'sentir o *quorum*'). Esse termo foi escolhido porque a ativação do fenômeno depende de uma densidade populacional (*quorum*) elevada (ANTUNES, 2003).

Quando as bactérias estão presentes em pequena quantidade em um ambiente, a concentração de auto-indutores é muito baixa para ser detectada. Entretanto, assim que um número maior de células é alcançado, essa concentração atinge um certo "limite", fazendo com que as bactérias ali presentes 'sintam' essas moléculas, e ativem ou reprimam genes específicos. Essa alteração de comportamento de acordo com a densidade populacional faz com que os genes expressos em uma situação de baixa concentração celular sejam diferentes dos que serão expressos quando for alcançado um número maior de indivíduos, de acordo com o interesse fisiológico da bactéria em cada um desses momentos (ANTUNES, 2003).

O *quorum-sensing* dos *S. aureus* é um sistema de comunicação bacteriana sobre a densidade de células presentes nos biofilmes, e o operon responsável é o *agr* que

consiste em 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), sendo que este operon é ativado durante a transição da fase de multiplicação exponencial para a fase estacionária por um mecanismo autorregulatório que envolve um peptídeo modificado que sinaliza a densidade celular (JEFFERSON, 2004).

A proteína de superfície Bap (proteína associada ao biofilme) é responsável pela adesão primária a superfícies e está também associada com o gene *ica* na adesão intercelular. O gene *bap* tem sido associado a patogenicidade da mastite por estirpes de *S. aureus*. No estudo feito por Cucarella et al. 2004, encontraram que *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina positivos para o gene *bap* foram significativamente melhores no processo de adesão e persistência na glândula mamária bovina “*in vivo*” e menos susceptíveis a tratamento por antibióticos quando presentes em biofilmes formados “*in vitro*”.

Em infecções por *S. aureus* a presença de fibrinogênio e fibrina ocorre na maioria dos casos sendo que a adesão do *S. aureus* ao fibrinogênio ocorre devido ao fator de adesão (*clumping-factor*) dos tipos A e B e a inativação dos genes *clfA* e *clfB* resulta na inibição da adesão de *S. aureus* a superfícies celulares ou não contendo fibrinogênio (WOLZ, et al. 2002).

CAIAZZA & O'TOOLE (2003) encontraram uma alfa-toxina, multimérica e hemolítica codificada pelo gene *hla*, que desenvolve um importante papel na formação de biofilmes. Um mutante para o gene *hla* foi incapaz de colonizar superfícies. Baseado em estudos microscópicos foi proposto que a alfa-hemolisina é requerida para a interação célula-célula durante a formação de biofilmes.

Muitas toxinas e proteínas são reguladas por genes globais em infecções por *Staphylococcus* conhecidos como genes *agr* (gene regulador acessório) e *sar* (gene regulador em *Staphylococcus*). O operon *agr* é conhecido por ativar a expressão de genes de exotoxinas como alfa-hemolisina, beta-hemolisina, toxina TSST-1 e enterotoxinas, e regula negativamente a síntese de proteínas de superfície como proteínas A e proteínas ligantes de fibronectinas. Vários estudos sobre essas proteínas e esses genes têm sido descritos em infecções em humanos, entretanto em animais e, principalmente em vacas com mastite existem poucos relatos (TAKEUCHI, et al. 2001).

SEO, YEON-SOO et al. (2008) avaliaram *Staphylococcus* isolados de animais e do ar de diferentes ambientes desde cafeteria a hospital veterinário quanto à capacidade de produção de biofilmes através de testes genéticos e fenotípicos, sendo que os genes avaliados foram: *ebpS*, *eno*, *cna*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *bbp* e *bap*. Concluíram que os *Staphylococcus* presentes no ar destes ambientes foram produtores de biofilmes com maior intensidade e que a presença destes grupos de genes foi maior que dos isolados de animais; ainda sugerem que este estudo pode ajudar no controle de micro-organismos presentes no ar de diferentes ambientes.

Gene	Proteína/Função	Espécies
<i>atpA</i>	Ligante amilase	<i>S. gordonii</i>
<i>uauA/B</i>	Proteína saliva humana e ligante de colágeno	<i>S. gordonii</i>
<i>ebpA</i>	Formação de polissacarídeo	<i>S. mutans</i>
<i>tarC</i>	Regulação do glucosiltransferase 5 proteína ligante de glucano	<i>S. mutans</i>
<i>isaADBC</i>	Síntese de adesina intercelular	<i>S. aureus</i>
<i>hla</i>	Toxina hemolítica	<i>S. aureus</i>
<i>clfA</i>	Fator de ligação A, proteína ligante de fibrinogênio	<i>S. aureus</i>
<i>atlA</i>	Esterificação de ácidos teicóicos	<i>S. aureus</i>
<i>atlE</i>	Autólise/adesina	<i>S. epidermidis</i>
<i>asp</i>	Proteína de associação acumulada	<i>S. epidermidis</i>
<i>bop ABCD</i>	Biofilme em superfícies plásticas	<i>E. faecalis</i>
<i>Eap</i>	Proteína de superfície de enterococos	<i>E. faecalis</i>
<i>AggA3</i>	Agregação envolvendo proteína de antígeno	<i>E. coli</i>
<i>comX</i>	Competência	<i>S. gordonii</i>
<i>Com ABCDE</i>	Competência	<i>S. mutans</i>
<i>lasS</i>	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>
<i>lasI</i>	Síntese de sinal 3OC12-HSL, sensor de quorum sensing	<i>P. aeruginosa</i>
<i>PBP7B</i>	Síntese de peptidoglicano	<i>S. gordonii</i>
<i>PBP5</i>	Síntese de peptidoglicano	<i>S. gordonii</i>
<i>gluNA</i>	Síntese de peptidoglicano	<i>S. gordonii</i>
<i>bwA</i>	Síntese de peptidoglicano	<i>S. gordonii</i>
<i>bapA</i>	Possível regulador de autólise	<i>S. mutans</i>
<i>cspA</i>	Proteína controle de carbono catabólico	<i>S. mutans</i>
<i>czt</i>	Regulador de metabolismo carbono global	<i>P. aeruginosa</i>
<i>dga</i>	Regulador de resposta ao stress	<i>S. mutans</i>
<i>siguab</i>	Resposta ao stress	<i>S. aureus/S. epidermidis</i>
<i>puuI</i>	Regulador da síntese de purina	<i>S. epidermidis</i>
<i>ruvS</i>	Regulador envolvido em baixa multiplicação	<i>E. coli</i>
<i>mutT</i>	Reparador de troca no DNA	<i>S. gordonii</i>
<i>tra</i>	Conjugação do Plasmídeo F	<i>E. coli</i>

Figura 3: Genes envolvidos no processo de formação de biofilmes (JEFERSON, 2004)

2.2 Os Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus que infectam células procarióticas. Podem ser utilizados no controle de biofilmes quando se faz inoculação de vírus e bactérias compatíveis. Alguns destes vírus podem induzir na bactéria o ciclo lisogênico, integrando seu material genético na bactéria, ou lítico, inativando-a. O estudo dos fagos tem fundamental importância para controle de biofilmes desde que não apresente risco à saúde humana e animal (MARQUES, 2005).

Os fagos têm ampla distribuição no planeta, estima-se que existam 10 fagos para cada célula bacteriana. Alguns fagos tem ampla abrangência outros são extremamente específicos. A utilização dos fagos líticos para terapia está sendo pesquisada na busca de novas alternativas mais eficientes de tratamentos nas infecções. O Comitê de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconhece 13 famílias e 31 gêneros de fagos (AZEREDO & SUTHERLAND, 2008).

No ciclo lítico os fagos inoculam seu material genético na bactéria direcionando a expressão de genes e proteínas responsável pela montagem de novas partículas de fagos. São interessantes para terapia devido ao fato de serem específicos afetando apenas as bactérias e não são tóxicos às plantas e aos animais (AZEREDO & SUTHERLAND, 2008).

2.3 Utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na visualização dos biofilmes

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de caracterização microestrutural, utilizada em diversos campos do conhecimento, principalmente na biologia e engenharia. A interação de um fino feixe de elétrons sobre a área ou o volume a ser analisado gera uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar propriedades da amostra tais como composição e superfície (GALLETI, 2003).

O feixe tem vários efeitos sobre o espécime a ser analisado, dos quais o principal para nossa finalidade é que ele faz com que o próprio espécime emita elétrons. A

imagem é construída em sequência, no tempo, à medida que o espécime é varrido. Os MEV apareceram no mercado, pela primeira vez, em 1965, e desde então se têm revelado indispensáveis em muitos tipos de pesquisa biológica, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo da morfologia de pólenes e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais (GALLETI, 2003).

Os principais componentes do MEV assemelham-se àqueles do MET (microscopia eletrônica de transmissão). A coluna, com o canhão eletrônico e a série de lentes eletrônicas, e o sistema de alto vácuo, são similares nos dois tipos de equipamentos. Um conjunto de bobinas defletoras faz com que o feixe varra o espécime. Assim, a imagem é montada ponto a ponto, linha por linha, do mesmo modo que a imagem no visor de televisão. A imagem pode ser observada diretamente, ou fotografada.

O MEV tem uma série de aspectos extremamente valiosos. Ele pode ser operado em uma escala ampla de aumentos, desde 10X até 100.000X. Seu alcance assim se estende desde aquele da lupa manual até o de um MET. O MEV tem grande profundidade de foco (MARQUES, 2005).

A resolução obtida com o MEV depende de uma série de fatores. O diâmetro da sonda do feixe eletrônico varrendo o espécime é o mais importante de todos, mas a natureza do espécime e a interação deste com o feixe também são influentes, bem como a velocidade de varredura e o número de linhas na imagem. Na prática, uma resolução de cerca de 10 nm pode ser conseguida sob condições favoráveis (MARQUES, 2005).

A microscopia eletrônica é indicada para a avaliação da interação microbiana do biofilme. Este método preserva muito das estruturas associadas que se mantêm em um estado hidratado e viável. A fixação das amostras é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (MARQUES, 2005). ZOLTAI et al. (1981) usaram, em uma das primeiras pesquisas de aderência bacteriana a superfícies que entram em contato com alimentos, um microscópio eletrônico de varredura para mostrar a aderência de *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus aureus* a superfícies de aço inoxidável e vidro. Segundo PIZZOLITTO (1997) o microscópio eletrônico de varredura

mostra uma imagem tri-dimensional, e a superfície topográfica da amostra é revelada com nitidez (SANTOS, 2009).

2.4 Utilização da técnica de ATP-bioluminescência

A bioluminescência, do grego *bios* para “vivo” e do latim “*lumen*” luz, é a luz produzida por uma reação química que ocorre num organismo, uma forma de luminescência ou emissão de “luz fria”, sem perdas de calor. Este tipo de emissão luminosa tem uma taxa de eficiência de 96% que é considerada alta quando comparada com a eficiência de 10% da luz incandescente (LELIEVELD et al. 2005).

O fenômeno de luminescência ocorre (Fig.4) quando uma molécula excitada pela absorção de energia, proveniente de uma reação química, retoma ao seu estado inicial com emissão luminosa. Nestas reações os substratos são de origem biológica, as enzimas luciferases (oxigenases), utilizam o oxigênio molecular para oxidar o substrato (luciferina), sendo esta reação traduzida pela emissão de um fóton por cada molécula de ATP (LIU et al. 2008).

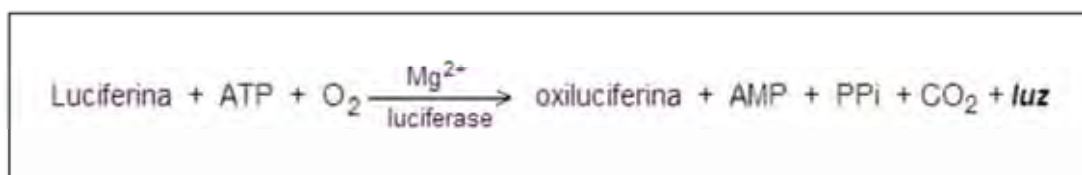


Figura 4 – Reação de detecção de ATP por bioluminescência (Adaptado de: Liu, Vico & Lindh, 2008).

A técnica em que se utiliza a enzima e substrato da libélula (luciferase e luciferina) para detectar e quantificar o ATP, medindo a saída de luz, foi descrita pela primeira vez em 1947. Desde então tem sido estudados os seus mecanismos detalhadamente e foram descritas diversas aplicações. Embora a essência do ensaio de quantificação de ATP por bioluminescência tenha permanecido inalterada desde a sua primeira descrição, foram descritas diversas pequenas modificações para aplicações específicas. O ensaio da luz emitida é efetuado num luminômetro sensível a

luz, obtendo-se o resultado em apenas alguns segundos. O resultado, normalmente expresso em unidades relativas de luz (URL), é apresentado na forma de relação linear com a concentração de ATP. Quanto maior a concentração de ATP nas amostras maior a intensidade da luz liberada. (FERREIRA, 2008).

Entre as principais vantagens do método de quantificação de ATP por bioluminescência encontram-se a sua rapidez de análise (poucos minutos), o baixo nível de detecção, inclusão de todos os tipos de micro-organismos ativos, fácil interpretação de resultados, automatização e análise no local, usando equipamentos portáteis (LARSON et al. 2003).

No entanto, apesar da rapidez e simplicidade do ensaio de quantificação de ATP o tornarem num método de grande interesse, existem também inconvenientes associados a este procedimento. A principal preocupação prende-se com os resultados apresentados pelo equipamento, em URL. Estas unidades não são comparáveis com os valores de contagem de colônias em placas. Deste modo, para se poder implementar este método é necessário completar anteriormente um processo de validação do método para as amostras que se pretende analisar. Para tal, efetuam-se ensaios no luminômetro acompanhados de contagens em placas para associar os dados. Este processo é moroso e eventualmente dispendioso mas, uma vez estabelecida a associação, só é necessário efetuar o ensaio no luminômetro (FERREIRA, 2008).

2.5 Utilização da eletroforese de campo pulsado como ferramenta epidemiológica

Para se conhecer a complexidade etiológica das mastites causadas por *S. aureus*, faz-se necessária a caracterização fenotípica e genotípica das estirpes envolvidas nos casos desta enfermidade, assim como do equipamento de ordenha. O conhecimento do perfil molecular dos clones de *S. aureus* possibilita estudos epidemiológicos de dispersão deste patógeno em propriedades rurais. Com isso, estratégias e protocolos de profilaxia e controle da mastite podem ser melhor elaborados (SANTOS et al. 2003).

A técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), conhecida como Eletroforese de Campo Pulsado ou, também, de Campo Pulsátil, foi desenvolvida em 1984 por Schwartz & Cantor. É uma variação de eletroforese em gel de agarose, mas que apresenta alto poder de tipagem para inúmeros micro-organismos, pois a alternância entre os sentidos do campo elétrico, ou pulsos, permite separar fragmentos que, convencionalmente, não seriam diferenciados em gel de agarose convencional que utilizam corrente elétrica constante. A PFGE é uma técnica com alta reprodutibilidade e recomendada como método altamente discriminatório por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas, também conhecidas como pulsotipos (MASLOW & MULLIGAN, 1996).

Segundo Birren e Lai (1993) "*pulsed field*" se aplica a qualquer modalidade de eletroforese que utilize mais que um campo elétrico direcionando de forma alternada. Quando ocorre troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são compelidas à reorientação para se posicionarem de forma paralela ao campo de força, antes de migrarem para a direção do pólo positivo. Os fragmentos menores se orientam com maior facilidade que os maiores, que demoram mais para se adaptarem à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico é chamado de tempo de pulso (*switch time*). O programa e aparelho CHEF é o mais difundido e os que utilizam alternância nos campos elétricos invertidos.

De modo geral, qualquer aparelho para a técnica de PFGE possibilita a separação de grandes fragmentos de DNA (600kb) ou ainda de cromossomos inteiros.

A utilização de técnicas moleculares para a diferenciação de estirpes de *S. aureus* isoladas em leite, água, ordenhadeira, mãos, tonsilas e fossas nasais de ordenhadores, associada aos métodos fenotípicos, como antibiograma e produção da enzima beta-lactamase, são de grande importância na identificação e na caracterização de isolados de *S. aureus* (LANGE et al. 1999).

Segundo FERREIRA et al. (2006), em trabalho realizado com 40 vacas da raça holandesa em uma propriedade rural do estado de São Paulo, isolou 77 estirpes de *S. aureus* de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Foram encontrados quatro padrões distintos de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos testados e nove

ribotipos diferentes, pela técnica de PCR-ribotipagem. A propriedade possuía rebanho fechado, justificando a existência de heterogeneidade genética entre estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina.

FERREIRA, (2008) estudou a relação epidemiológica, pela técnica da eletroforese de campo pulsado (PFGE), existente entre 245 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, de óstios papilares da glândula mamária e de insufladores da ordenhadeira, com vistas aos sítios de localização e vias de transmissão. A PFGE revelou 39 pulsotipos distintos, dos quais 25 (64,1%) encontraram-se distribuídos nas estirpes obtidas do leite. Foi observado, também, por meio da PFGE, que nenhum pulsotipo foi isolado por mais de três colheitas consecutivas e que somente o pulsotipo 29 foi identificado em cinco (31,2%) colheitas, sendo quatro dessas colheitas sucessivas.

O estudo das características genotípicas, fenotípicas e epidemiológicas dos *S. aureus*, se faz necessário devido a importância deste agente na mastite bovina, seja ela clínica ou subclínica. No Brasil são poucos os estudos envolvendo biofilme e os micro-organismos na mastite, assim sendo, a proposta deste estudo foi de identificar vários genes envolvidos no processo de formação de biofilme das estirpes de *S. aureus*, fazer o monitoramento epidemiológico destas estirpes com vista aos sítios de localização no ambiente de ordenha, e também avaliar a resistência bacteriana frente aos antimicrobianos procurando-se assim gerar novos conhecimentos e instituir medidas de prevenção e tratamento para a mastite estafilocócica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar os animais com mastite subclínica utilizando o “*California Mastitis Test*”.

3.2.2 Isolar e identificar os *S. aureus* de ambiente de ordenha (insufladores; mangueiras; borracha do vácuo; borracha da tampa do tanque de equilíbrio; mãos de ordenhadores, saída do tanque de equilíbrio e superfície do tanque de expansão).

3.2.3 Identificar os *S. aureus* tanto de amostras de leite (de vacas e de tanque de expansão) quanto do ambiente de ordenha utilizando os testes bioquímicos e genéticos.

3.2.4 Avaliar as produções de “*slime*” através da morfologia dos *S. aureus* apresentada no Agar vermelho congo (CRA).

3.2.5 Determinar a capacidade dos *S. aureus* produzirem biofilmes “*in vitro*” pelo método de aderência em microplacas.

3.2.6 Identificar os produtos dos genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *hdl*, *sar*, *hla*, *clfA*, *clfB* envolvidos no processo de formação de biofilmes e o produto do gene *tsst* responsável pela formação da toxina da Síndrome do choque tóxico e sua associação com os genes do biofilme, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.7 Verificar a formação de biofilmes pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina e do ambiente de ordenha através da análise das imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), em cupons de aço inoxidável.

3.2.8 Verificar a formação de biofilmes através das imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura nas borrachas dos insufladores e de uma borracha da tampa do tanque de equilíbrio após 3 e 12 meses de uso.

3.2.9 Verificar a relação epidemiológica existente entre as estirpes de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite com vistas aos sítios de localização e vias de transmissão.

3.2.10 Investigar, por meio da persistência dos padrões fenotípicos e genotípicos, a dinâmica das estirpes de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite, do ambiente de ordenha e do leite do tanque de expansão de uma propriedade rural produtora em Minas Gerais.

3.2.11 Verificar a sensibilidade “*in vitro*” das estirpes de *S. aureus*, não aderidas, oriundas de leite de vacas com mastite bovina, leite do tanque de expansão e ambiente de ordenha frente aos antimicrobianos pelo teste de difusão em disco.

3.2.12 Verificar a sensibilidade dos *S. aureus*, sensíveis aos antimicrobianos no teste de disco, após serem submetidos a formação de biofilme, pelas técnicas de ATP-bioluminescência e Contagem de Unidades Formadoras de Colônias.

3.2.13 Analisar a eficiência do hipoclorito de sódio em duas concentrações e, em quatro tempos diferentes, em estirpes de *S. aureus* aderidas e não aderidas, isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e do ambiente de ordenha por meio do teste de contagem padrão em placas e teste de microplacas.

3.2.14 Verificar por meio de microscopia de fluorescência (DAPI) a eficiência do hipoclorito de sódio nas estirpes de *S. aureus* isoladas do ambiente de ordenha e leite de vacas com mastite subclínica.

3.2.15 Verificar a presença de Pró-fagos em estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite subclínica e do ambiente de ordenha.

3.2.16 Isolar possíveis fagos líticos que atuem nas estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite subclínica e do ambiente de ordenha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras de leite

4.1.2 Características da propriedade rural e do rebanho

Foram colhidas amostras de leite de um rebanho de 81 vacas aparentemente sadias, porém reagentes ao CMT, durante período de doze meses de agosto de 2008 a julho de 2009, na ordenha da tarde, em uma propriedade rural produtora de leite tipo B no Município de Indianópolis, Estado de Minas Gerais. O rebanho leiteiro era constituído por vacas da raça Girolando, cuja produção global média situava-se em torno de 1400 litros diários cuja ordenha era efetuada mecanicamente em sistema de circuito fechado e realizada duas vezes ao dia.

4.1.2.1 Alimentação do rebanho

A alimentação do rebanho era dividida em dois períodos, período de seca que era entre as datas de 15 de julho a 15 de novembro e período das águas, com as datas de 16 de novembro a 14 de julho. No período seco a alimentação era constituída de silagem de milho (24%), polpa cítrica (2Kg por animal), sendo a polpa cítrica oferecida para todos os animais. Foi também feita a alimentação separada por lotes, sendo que o lote de vacas recém-paridas e com produção de 18 a 30 litros de leite recebiam um terço da alimentação com ração e o restante complementado com silagem de milho e polpa cítrica. O lote de vacas de primeira cria, com produção de leite média acima de 25Kg a alimentação era constituída de silagem de milho e ração, sendo complementadas com polpa cítrica. Todos os animais recebiam uma complementação da alimentação com sal mineral.

Para as novilhas com produção abaixo de 18 litros de leite era fornecida alimentação a base de cana com uréia e enxofre (sendo a proporção de enxofre e uréia, de uma parte para nove partes), além da ração e sal mineral.

No período das águas, os animais se alimentavam a pasto de capim *Brachiaria*, Tanzânia e Mombaça, e complementados com ração no coxo e polpa cítrica.

4.1.3 Seleção dos animais

Todas as vacas lactantes aparentemente sadias foram submetidas mensalmente à prova do *California Mastitis Test* (CMT). Também foi investigada a presença de animais com quadro clínico de mastite, sendo então desconsideradas as vacas que apresentaram reações positivas ao CMT nos primeiros 10 dias de lactação e nos 30 dias anteriores à secagem. Foram colhidas, de acordo com as normas de assepsia propostas por Harmon et al. (1990), amostras de leite dos animais reagentes ao CMT e dos que apresentaram sinais evidentes da presença de mastite clínica.

4.1.4. Colheita das amostras

4.1.4.1 Amostras de leite dos quartos mamários para o isolamento bacteriológico

As amostras foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON, 1990). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) foram utilizados tubos de ensaio esterilizados para acondicionar amostras individuais de 2 a 5 mL de leite de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Os tubos contendo as amostras foram colocados em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável, e então foram levados ao laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, para isolamento e identificação bacteriana.

Posteriormente, as estirpes isoladas foram levadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água e Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - UNESP – Jaboticabal-SP, para as análises epidemiológicas e genotípicas.

4.1.4.2 Amostras dos insufladores, mangueiras, tanque de equilíbrio, saída do tanque de equilíbrio e superfície do tanque de expansão

Imediatamente após as ordenhas, os suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (quatro por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos de ordenhadeiras conforme recomendação de McDonald et al. (1993). Foram friccionados também em cada uma das mangueiras condutoras de leite, na borracha do tanque de equilíbrio, consiste em um aparelho que recebe o leite coletado pelos conjuntos de ordenha, os quais são instalados na tampa do mesmo, e através de um sensor de nível ligado a uma bomba de leite, sanitária, transfere o leite para o refrigerador através de uma mangueira, constituído de aço inox, com suporte para até 5 conjuntos de ordenha, na superfície do tanque de expansão, na borracha do vácuo e no bocal da saída do leite para o tanque de expansão por um período de doze meses, sendo uma colheita em cada mês, compreendido entre os meses de outubro de 2008 a setembro de 2009, este período de

colheita foi diferente do início da colheitas das amostras de leite devido ao fato de ter sido feito testes sobre o suabe dos equipamentos ante e pós ordenha, sendo definido que somente seria possível o isolamento de micro-organismos com suabes pós ordenha, pois antes do início da ordenha era feita uma sanitização que influenciava ao não isolamento bacteriano. Os suabes foram acondicionados em tubos de ensaio individuais contendo caldo BHI estéril e transportados em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável.

4.1.4.3 Amostras das mãos dos funcionários

Imediatamente após as ordenhas, no período de outubro de 2008 a setembro de 2009, sendo uma colheita em cada mês, os suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na palma de cada uma das mãos e entre os dedos dos dois funcionários, após os mesmos terem lavado suas mãos com detergente neutro e secadas com papel toalha (BRESOLIN, et al. 2005).

4.1.4.4 Amostras de leite do tanque de expansão

As amostras de leite oriundas do tanque de expansão foram colhidas de acordo com o preconizado por BRITO et al. (1998). A colheita foi feita, em duplicata, sendo as amostras mensais por período de doze meses, de agosto de 2008 a julho de 2009, retirando-se 20 mL de leite com pipeta esterilizada, da parte superior e central do tanque logo após a homogeneização do leite. Imediatamente após a ordenha, as amostras foram acondicionadas em frasco de vidro esterilizado, disposto imediatamente em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e levados ao laboratório para análise.

4.2 Exames Laboratoriais

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram isoladas seguindo o seguinte procedimento. Para cada amostra de leite dos quartos mármario e do leite do tanque de expansão foram semeados dez microlitros sobre a superfície do Ágar Baird-Paker em placas de Petri, em duplicata. Para as amostras dos suabes dos equipamentos do

ambiente de ordenha e das mãos dos funcionários, após 24 horas de incubação dos suabes em meio BHI à 37°C, foram semeados uma alçada em placas contendo meio Ágar Baird-Parker (Mac FADDIN, 1976; APHA, 2001).

Todas as placas com Ágar Baird-Parker foram incubadas à 37°C durante 24 a 48 horas. Após a incubação colônias sugestivas de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à coloração pelo método de Gram.

As colônias classificadas como cocos Gram-positivos foram submetidas às provas da catalase e coagulase lenta com plasma de coelho (Mac FADDIN, 1976; APHA, 2001). As estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas à prova para verificação da produção de acetoina (caldo MRVP - Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius*.

As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose (Mac FADDIN, 1976; MURRAY et al. 1999; APHA, 2001), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*. As estirpes que se mostraram positivas a essas provas foram classificadas como *Staphylococcus aureus* (HOLT et al. 1994).

4.2.1 Teste da Catalase

Com uma alça bacteriológica flambada, retirou-se uma determinada quantidade de cultivo de *Staphylococcus* sp. Logo após foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionando-se uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% sobre os micro-organismos na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas (Mac FADDIN, 1976).

4.2.2 Teste da Coagulase Livre em Tubo

Em tubos de vidro estéreis (13x100) foram depositados 0,5 mL de plasma de coelho, diluídos 1:5. Adicionou-se também 0,5 mL de cultura pura de estirpe de *S.aureus* crescidas após 24 horas de cultivo em caldo BHI. Os tubos foram inclinados, suavemente, sem agitar e incubados a 37°C em banho-maria.

Foram analisados quanto à formação do coágulo com 1 hora após incubação em banho-maria e posteriormente a cada uma hora logo após a primeira hora até completar 4 horas, depois com 12, 18 e 24 horas. Foram consideradas estirpes positivas aquelas que coagularam o plasma, formando um coágulo visível (Mac FADDIN, 1976).

4.2.3 Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoina a partir da glicose, as estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP (Methyl-red Voges-Proskauer Broth) e incubadas à 37°C por 48 horas. Em seguida, foi adicionado 0,6 mL de uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação foi feita a leitura, sendo considerados positivos os tubos em que a cultura apresentou a coloração vermelha em até 15 minutos (Mac FADDIN, 1976).

4.2.4 Teste de Fermentação da Maltose e Trealose

As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização da maltose e trealose (Vetec), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*. Estes testes foram realizados em Ágar-Base Vermelho de Fenol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 1% do respectivo carboidrato, sendo que o carboidrato foi adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana com poro de 0,45µ de diâmetro. Foi inoculado o micro-organismo a ser testado no meio suplementado com o carboidrato específico e incubado em estufa bacteriológica a 35-37° C por até 24 horas. Leitura: Prova positiva: multiplicação do micro-organismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para amarelo). Prova negativa: multiplicação do micro-organismo sem alteração de cor (Mac FADDIN, 1976; MURRAY et al. 1999; APHA, 2001).

4.3 Extração do DNA

Para a extração de DNA das estirpes isoladas utilizou-se o Kit Invitex®, Extração de Material Genômico, que continha o protocolo de extração de DNA para bactérias

Gram-positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas de purificação (LISING, et al. 2004).

Foi centrifugado 1,5mL de cultura em caldo BHI (37°C/18 horas a 24 horas) a 10.000 rpm por 3 minutos e 30 segundos. Em seguida, todo o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito de sódio. O precipitado foi ressuspensionado em 400 µL de tampão de ressuspensão R, transferido para o tubo de extração L e incubado a 37°C por 10 minutos, sob constante agitação. Posteriormente, a amostra foi incubada a 65°C por 10 minutos e por fim incubada a 95°C por 5 –10 minutos sobre constante agitação. Para manter as amostras sobre agitação constante utilizou-se Thermomixer compact.

Foi adicionado à amostra 400µL do tampão de ligação B6, homogeneizou-se e em seguida todo o conteúdo do tubo de extração L foi transferido para o conjunto de colunas com filtros para rotação, incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos, com posterior descarte do filtrado. Ao conjunto de colunas com filtro foi adicionado 500µL de tampão de lavagem I. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos. O filtrado foi descartado juntamente com o tubo, sendo que o conjunto de colunas com filtro foi colocado em um novo tubo receptor.

Ao conjunto de colunas com filtro foi adicionado 600µL de tampão de lavagem II e posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos. Após o descarte do filtrado, a amostra foi novamente centrifugada para prover total eliminação do tampão de lavagem II, a 13.200 rpm por 3 minutos e 30 segundos, sendo o filtrado descartado juntamente com o tubo. O conjunto de colunas com filtro foi colocado em um tubo receptor de 1,5 mL.

Ao conjunto de colunas com filtro foi adicionado 200µL do tampão de eluição D, previamente aquecido a 70°C. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida, centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos. O filtrado continha o material genético desejado, sendo armazenado em freezer a -20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

4.4 Amplificação de fragmento de DNA cromossomal para identificação de estirpes de *Staphylococcus aureus*

De acordo com o protocolo descrito por Martineau et al. (1998), as reações tiveram volume final de 20µL, com 20mM Tris-HCL pH-80; 50mM KCL; 2,5mM MgCl₂; 0,2mM de cada dNTP; 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Brasil) Sa442-1 (5' - AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA -3'), e 0,5U de *Taq polimerase* (Invitrogen, Brasil) em amplificação do tipo *host- start*. As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por 3 minutos, a 94°C e posteriormente, a 30 ciclos de 1 segundo, a 95°C, para desnaturação à 30 segundos, a 55°C, para anelamento e extensão dos oligonucleotídeos.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, em cuba horizontal. Sendo assim, 10µL do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com o corante Gel red (Uniscience) a uma concentração de 50 µL/L e submetido à corrida eletroforética a 120 volts por 90 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen, Brasil), disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese, como padrão para o tamanho das bandas de DNA formadas. O tamanho dos segmentos amplificados era de 108 pb. O produto de eletroforese foi visualizado em aparelho fotodocumentador Gel Doc 2000 – BioRad.

4.5 Teste do Ágar Vermelho Congo

A produção de biofilmes pelas estirpes de *S. aureus* foram determinadas pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA) {0,8g de corante vermelho congo [Sigma] para 1 Lt de Brain Heart Infusion Agar (BHI) [sigma] e 50 gramas de sacarose [sigma]} (FREEMAN et al. 1989). Para tanto as placas de Ágar Vermelho Congo foram inoculadas e incubadas à 37°C por 24 horas, seguido por uma incubação à temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas e negras foi utilizada para diferenciar de estirpes não produtoras de biofilmes, as quais apresentaram colônias

lisas e vermelhas. Foram também utilizadas as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e (ATCC 12228), para fins de controle positivo e negativo respectivamente.

4.6 Produção de biofilmes "*in vitro*"

A capacidade de produção de biofilmes "*in vitro*" foi determinada de acordo com o método citado por Cucarella et al. 2001, com pequenas modificações descritas abaixo. As estirpes de *S. aureus* foram cultivadas individualmente, por uma noite, no TSB a 37°C e diluídas 1:200 em TSB (Tryptic Soy Broth) contendo 0,25% de glicose. A seguir, 200µL de células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo "U" e incubadas por 24 horas à 37°C com agitação. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) e logo após foi adicionado 200µL metanol para fixação e deixados até a secagem da placa, em torno de 15 minutos. Adicionou-se 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos. Em seguida as placas foram lavadas com água destilada e após estarem secas adicionou-se 200µL de ácido acético a 33% para ser feita a leitura a 492nm (Thermoplate reader).

Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em duplicata e o teste foi repetido 3 vezes, sendo consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al. 2000).

4.7 Caracterização Genotípica

Análise do DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes envolvidos na formação de biofilmes: *icaA* , *icaD*, *bap*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *hdl*, *sar*, *hla*, *clfA* , *clfB* e *tsst-1*.

4.7.1 Operon *ica*

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos produtos dos genes *icaA* e *icaD* foram descritos do Gen Bank sequência do *ica* operon (CRAMTON et al. 1999) (Tabela 1). O volume de 20µL de reação final consistiu em 2,5mM MgCl₂ , 200µM

de cada nucleotídio, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25U de Taq polimerase e 100ng de DNA molde. Trinta ciclos de amplificação que consistiram na desnaturação a 92°C por 45 segundos, anelamento a 49°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf). A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 1% de gel de agarose corado com Gel red (Uniscience). Foi utilizado um marcador de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil). Foram consideradas positivas as estirpes com tamanho de banda de 1315pb e 381pb para os produtos dos genes *icaA* e *icaD* respectivamente. As cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva).

4.7.2 Operon *bap*

Para a amplificação do produto do gene *bap* foram utilizados os oligonucleotídeos descritos do Gen Bank relatados por Cucarella et al. (2004) (Tabela 1). Consistiu em uma incubação a 94°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 20 segundos, anelamento a 42°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos. Extensão final de 72°C por 5 minutos. Foram consideradas positivas as estirpes com tamanho de banda de 971pb visualizadas no gel de agarose.

4.7.3 Operon *agr*

Para a amplificação dos produtos dos genes *agrABCD* foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Kornblum et al. (1990) e citado por Takeuchi et al. (2001) (Tabela 1). Consistiu em 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 54°C 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O tamanho de banda para estes produtos foram os seguintes: 1087pb, 1223pb, 610pb para os genes *agrBD-hdl*, *agrC* e *agrA* respectivamente.

4.7.4 Operon *sar* e *hla*

Para a amplificação dos produtos dos genes *sar* e *hla* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos descritos abaixo (Gen Bank SAU46541) (Tabela 1). Para a amplificação dos genes *hla* e *sar* foram utilizados os oligonucleotídeos relatados por

Wolz et al. (2000). Consistiu em 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 54°C 1 minuto e 72°C por 1 minuto para reação dos dois genes. Os tamanhos de bandas para os produtos destes genes foram: 275pb e 600pb para *sar* e *hla* respectivamente.

4.7.5 Operon *clfAB*

Para a amplificação dos produtos dos genes *clfA* e *clfB* foram utilizados, respectivamente, os oligonucleotídeos descritos por: Yeon-Soo-Seo et al. (2008) e Eidhin et al. (1998) (Tabela 1). Foi feita uma incubação a 94°C por 4 minutos; seguida de 30 ciclos 94°C por 1 minuto; 50°C por 1 minuto e meio e 72°C por 1 minuto e meio, e uma extensão final de 10 minutos. Os tamanhos de bandas para os produtos dos genes *clfA* e *clfB* foram: 292pb e 205pb respectivamente.

4.7.6 Operon *tsst*

Para a amplificação do produto do gene *tsst* foram utilizados os oligonucleotídeos segundo protocolo de Cunha et al. (2007) (Tabela 1). As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de 94°C por 4 minutos, à desnaturação a 94°C por 2 minutos, pareamento a 55°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a 72°C por 1 minutos e 30 segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, pareamento a 53°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C a 1 minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de pareamento foi reduzida a 51°C, seguido por mais 37 ciclos a 94°C por 2 minutos, 51°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. No final dos 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 7 minutos e a 4°C até o momento de retirada do termociclador. Para o produto deste gene o tamanho de banda visualizado foi de 350pb.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na pesquisa.

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores
<i>icaAF</i>	5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3'
<i>icaAR</i>	5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'
<i>icaDF</i>	5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3'
<i>icaDR</i>	5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'
<i>clfAF</i>	5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3'
<i>clfAR</i>	5'-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3'
<i>clfBF</i>	5'-ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC-3'
<i>clfBR</i>	5'-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3'
<i>bapF</i>	5'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC-3'
<i>bapR</i>	5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'
<i>agrAF</i>	5'-ATGGAAATTGCCCTCGCAAC-3'
<i>agrAR</i>	5'-TTCTCACCGATGCAATAGCAG-3'
<i>agrBD,hdl: F</i>	5'-GTTCACTGTGTCGATAATCC-3'
<i>agrBD,hdl: R</i>	5'-CCACCTACTATCACACTCTC-3'
<i>agrCF</i>	5'-TGATAGCGCGTCCTTAATCA-3'
<i>agrCR</i>	5'-AGACCTAAACCACGACCTTC-3'
<i>hlaF</i>	5'-AGAAAATGGCATGCACAAAAA-3'
<i>hlaR</i>	5'-TGTAGCGAAGTCTGGTGAAAA-3'
<i>sarAF</i>	5'-TTGCGCTAAATCGTTTCATTATTAA-3'
<i>sarAR</i>	5'-AATTTTCGTTGTTTGCTTCAGTGA-3'
<i>tsst-1F</i>	5'- ATGGCAGCATCAGCTTGATA-3'
<i>tsst-1R</i>	5'- TTTCCAATAACCACCCGTTT-3'

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.8.1 Preparação dos cupons de aço

Os suportes utilizados para a adesão das células bacterianas foram cupons de aço inoxidável AISI 304 com 10 x 20 mm, adquiridos comercialmente - ICAM (Indústria e Comércio Ltda - São Carlos/SP), os quais foram higienizados com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro durante uma hora, enxaguados com água destilada estéril, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada estéril, secos por duas horas a 60°C e autoclavados a 121°C/15 minutos (MARQUES, 2005).

4.8.2 Preparação da suspensão bacteriana para formação de biofilmes em cupons de aço

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram reativadas em 3,0mL de BHI incubados de 18-24 horas em estufa de 35-37°C. A seguir 50 cupons de aço inoxidável foram colocados em tubos falcon contendo 6 mL de caldo BHI cada e 1 mL da cultura bacteriana. As estirpes foram escolhidas aleatoriamente sendo 25 estirpes do ambiente de ordenha e 25 oriundas do leite de vacas com mastite. Os tubos foram incubados sob agitação de 120rpm, a 37°C por 72 horas, sendo que nas primeiras 24 horas o meio foi trocado. Após isso os cupons foram removidos e lavados com tampão fosfato salina estéril (PBSpH 7,4), removendo-se assim as células não aderidas (MARQUES, 2005).

4.8.3 Preparação das borrachas dos insufladores e da tampa do tanque de equilíbrio

Foram analisadas 6 borrachas de silicone, sendo 5 delas pertencentes aos conjuntos de insufladores (1 borracha de cada conjunto) e 1 borracha da tampa do tanque de equilíbrio. Todas as borrachas já estavam bem desgastadas e tinham em torno de 3 a 4 meses de uso nos insufladores, e mais de um ano de uso a borracha da tampa do tanque de equilíbrio, sendo nesta observada um corte de aproximadamente 3 cm onde estavam retidos resíduos do leite que entravam em contato com tanque de equilíbrio. Todas as borrachas foram gentilmente doadas pelo proprietário da fazenda leiteira, após tê-las trocado pelas borrachas novas no mês de novembro de 2008. As borrachas foram cortadas em 0,5cm para a análise no MEV.

4.8.4 Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Conforme o protocolo de rotina de trabalho (SANTOS & MAIA, 1997) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal – SP, as amostras em cupons de aço inoxidável e das borrachas de silicone foram fixadas em glutaraldeído 3% e lavadas em tampão fosfato

(pH 7,4; 0,1M) por 48 horas. Depois foram lavadas em tampão por 3 a 4 vezes para retirar o excesso de fixador. Após este procedimento, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% *over-night* sob temperatura ambiente, em uma capela. Lavou-se em tampão por 3 a 4 vezes para retirar o excesso de tetróxido de ósmio, fez-se a desidratação em gradiente crescente de acetona: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% com intervalos de 20 minutos e 100% por 3 vezes, também com intervalos de 20 minutos. Em seguida as amostras foram para o secador de ponto crítico para completar a secagem, montadas em *stubs* e cobertas com ouro. Ao final deste procedimento, os cupons e as borrachas foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5410), com o objetivo de visualizar a interação entre bactéria e superfície.

4.9 Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE)

De acordo com o protocolo estabelecido por McDougal et al. (2003) e adaptado do Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular da Universidade de São Paulo, foi utilizada uma única colônia de *S. aureus* e semeada em 5mL de caldo Todd Hewit (THB) incubados em agitação vigorosa a 35-37°C por 24 horas. O ajuste da concentração bacteriana foi feito em espectrofotômetro com a adição de salina e absorbância de 0,9 a 1,1 com comprimento de onda de 610nm.

Foi transferido 1,5mL do caldo para microtubo (eppendorf), depois foi centrifugado por 2 minutos a 12.000rpm e o sobrenadante foi removido. Foi suspenso o precipitado em 500µL de solução TE tampão TE (10mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e equilibrado em banho maria a 37°C por 10 minutos e centrifugado novamente a 12.000rpm por 2 minutos. Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado foi resuspenso novamente em 150 µL de tampão TE. O tubo foi colocado em banho maria a 45°C e logo adicionada a agarose de baixo ponto de fusão (Low melting) a 2% na mesma quantidade do precipitado 150µL. Foram gotejadas 20µL em uma placa de vidro recoberta com parafilme. As gotas foram cobertas por uma lâmina. Deixou-se 10 minutos a temperatura ambiente para secar.

Os discos de agarose foram cuidadosamente removidos para um tubo de falcon de 15mL com uma alça descartável. Foi colocado no 3mL de tampão de lise EC (6 mM

Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de lauroylsarcosine, pH 8,0) contendo lisostafina 50µL (1 mg/mL), incubados a 37°C por, no mínimo, 4 horas. Posteriormente, o tampão de lise EC foi descartado e adicionados 4mL de novo tampão de lise contendo proteinase K 1 mg/mL e lisozima 20µg/mL e deixado 18 horas incubando a 50°C.

Posteriormente, o tampão de lise EC foi descartado e adicionados 8mL de tampão TE, incubando a 37°C por 30 minutos, e esta troca repetida, no mínimo, mais quatro vezes. Até posterior utilização para a digestão restritiva com enzima *SmaI*, que cliva o DNA cromossômico no sítio de restrição CCC/GGG, os blocos foram armazenados a 4°C.

Para a digestão restritiva com *SmaI*, foi transferido um bloco para novo tubo de ensaio com 200µL de tampão de restrição 1x, para equilíbrio do bloco, e incubados a 25°C por pelo menos 30 minutos. Após a remoção deste tampão, foi acrescentado 200µL de reação, desta vez com 5µL da enzima *SmaI*, em cada tubo, com incubação a 25°C por 4 horas.

Após a solidificação do gel de agarose de grau cromossomal (*cromosomal grade agarose*, BioRad) a 1% preparado em tampão 0,5x TBE, os blocos foram introduzidos diretamente nos poços formados com a retirada do pente que acompanha o aparelho. Para a vedagem, foi utilizado a mesma agarose equilibrada a, aproximadamente, 56°C, com a finalidade de impedir que os blocos saiam dos poços. A eletroforese foi realizada com célula de eletroforese CHEF-DR III (BioRad, Melville, N. Y.) e, como padrão, foi utilizado DNA do bacteriófago, que servirá como controle dos parâmetros de corrida das unidades CHEF-DR. Os padrões de corrida foram os seguintes: pulso inicial, 5 segundos; pulso final, 40 segundos; voltagem, 200 V ou 6 V/cm; tempo, 21 horas; e temperatura, 14°C.

Para que os fragmentos de DNA fossem corados, os géis foram colocados, sob imersão, em 100µL de tampão TE com 10µL de brometo de etídio por 45 minutos. Em seguida sendo descorados em água destilada, por 25 minutos, e fotografados posteriormente com a visualização dos diferentes pulsotipos no sistema de fotodocumentação GelDoc® (BioRad).

4.9.1 Classificação dos Pulsotipos

A classificação dos pulsotipos em grupos foi gerada pela análise de agrupamento por método hierárquico (SNEATH & SOKAL, 1973) utilizando como medida de semelhança entre os pulsotipos o coeficiente de Jaccard e a ligação dos grupos pelo método WARD (WARD, 1963). Todo o processamento das análises estatísticas foi feito no ambiente R (R Development Core Team, 2010), versão 2.11.0 sendo utilizado o pacote “VEGAN” além dos pacotes da distribuição base. Todas as análises foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, SP, UNESP

4.10 Teste de sensibilidade das estirpes de *S. aureus* aos antimicrobianos

As estirpes de *S. aureus* foram submetidas ao teste de sensibilidade “*in vitro*” a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al. 1966). Desse modo, foram utilizados multidiscos de antibióticos para micro-organismos gram positivos (Laborclin), os quais consistiam em unidades plásticas às quais estavam aderidos 12 discos de papel com diâmetro de 6 mm, impregnados com antibióticos para uso em antibiograma por difusão em agar (placas de 140mm de diâmetro), contendo o Ágar Müller–Hinton (NCCLS, 2000).

As placas e as unidades com os multidiscos foram retiradas da geladeira para adquirirem a temperatura ambiente cerca de 30 minutos antes da execução da prova. As colônias foram retiradas do agar sangue com alça de semeadura devidamente flambada e inoculadas em caldo cérebro-coração por 12 horas a 37°C em estufa bacteriológica para multiplicação. Comparou-se o grau de turvamento dos tubos com o grau 0,5 da escala Mac Farland. Um suabe estéril foi colocado dentro do tubo contendo o caldo cérebro coração, retirou-se o excesso comprimindo-o na parede do tubo. Em seguida semeou-se com suabe no agar Müller Hinton em todas as direções da placa

abrangendo toda a superfície e após 15 minutos com auxílio de uma pinça flambada colocou-se a unidade de multidiscos sobre a superfície do agar do meio inoculado.

A placa foi incubada invertida em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas para avaliação dos resultados. Com a ajuda de uma régua mediu-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco e foi consultada uma tabela apropriada para determinar se o *S. aureus* foi sensível ou resistente aos antimicrobianos testados. Os antimicrobianos presentes no multidiscos e testados foram: cefepime (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), penicilina G (10 Un), rifampicina (30µg), sulfazotrin (25µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg), sendo que foi utilizada a cepa 29213 como controle.

4.11 Antibiograma para estirpes de *S. aureus* em biofilmes formadas em microplacas com 96 poços em fundo “U”.

A técnica para cálculo de concentração mínima erradicação de biofilmes (MEBC) para bactérias em biofilmes foi feita de acordo como descrito por Amorena, 1999 com algumas modificações. O volume 25µL de cultura bacteriana (18 horas a 37°C) em TSB foram adicionados a 175µL de TSB adicionado de 2% de glicose em placas com 96 poços de fundo “U”. As placas foram incubadas para formação de biofilmes com 24 horas de formação a 37°C, sendo que o biofilme de 24 horas teve o meio renovado após 12 horas de cultivo. Após esses períodos as placas foram lavadas com tampão PBS, pH:7,4 para remover as bactérias que não se aderiram. 100µL do meio Mueller-Hinton e 100µL dos antibióticos nas concentrações de 100mg/L e 500mg/L foram adicionados nas placas e incubados a 37°C por 6 horas.

Foram testadas 36 estirpes que foram sensíveis ao mesmo tempo no teste de disco aos seguintes antimicrobianos, vancomicina, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina e rifampicina, para micro-organismos gram positivos. Após 24 horas os antibióticos foram descartados e as bactérias viáveis foram avaliadas sobre duas formas, uma placa foi utilizada para contagem padrão em placas pelo método de gotejamento em triplicata, e outra placa por bioluminescência, após adição de uma

solução que extrai ATP, neste caso, foi utilizado o DMSO e logo após foi feito banhos de ultrassom de 15 minutos a 40 hertz. Em seguida, utilizou-se placas opacas, para serem quantificadas por ATP – bioluminescência utilizando Kit *ATP Bioluminescence Assay Kit HS II* (Roche). Os testes foram feitos em triplicata e as estirpes não tratadas com antibióticos foram utilizadas como controle.

As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC/CFUs) das estirpes aderidas as placas (biofilme 24 horas) foram realizadas tanto antes da adição do antimicrobiano (controle) quanto após a adição do antimicrobiano pelo período de 6 horas. A placa foi lavada 3 vezes com solução PBS e logo após foram colocados mais 200µl de PBS estéril para que as placas pudessem ser raspadas com as ponteiros de 200µl e feitas as diluições para se efetuar as contagens bacterianas em ágar TSA (AMORENA et al. 1999).

4.12 Estirpes utilizadas

Utilizou-se 12 estirpes de *S. aureus* oriundas de leite de vacas com mastite subclínica, leite do tanque de expansão e do ambiente de ordenha (insufladores, mangueira). As estirpes foram selecionadas aleatoriamente de um grupo de 47 estirpes (também escolhidas aleatoriamente por sorteio) que haviam sido enviadas a Universidade do Minho em Portugal. Em virtude do tempo para a realização dos testes e também da necessidade de material para realizá-lo, optou-se para trabalhar com os 12 isolados de *S. aureus*. Todos os procedimentos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biofilmes na Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar, Braga, Portugal.

4.12.1 Teste da Adesão Estática e Utilização do Hipoclorito de Sódio

Com uma alça estéril uma colônia do *S aureus* foi semeada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) incubando a 37°C por 24 horas, logo após as estirpes foram centrifugadas a 4°C por 9000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos. As estirpes foram lavadas com NaCl (0,9%), e centrifugadas em seguida, por duas vezes esse procedimento foi repetido, depois homogeneizou-se em vórtex e foi feita a leitura a

densidade óptica (DO) a 640nm e acertado a concentração de 0,5. As estirpes foram pipetadas nas placas de 96 poços e incubadas por duas horas a 37°C a 120rpm. Logo após a incubação as placas foram lavadas uma vez com NaCl (0,9%). Adicionou-se o hipoclorito de sódio a 150ppm (partes por milhão) e 300ppm. Cada placa foi testada nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos e incubadas a 37°C , 120 rpm. As placas foram lavadas com NaCl (0,9%) por duas vezes e depois colocado novamente para raspar o fundo das placas com ponteira de 200µL e seguido o procedimento da contagem padrão em placas (GOMES, 2010).

4.12.2 Formação dos Biofilmes em Placas e Utilização do Hipoclorito de Sódio

Em um tubo falcon de 10mL adicionou-se, 9990µL de meio TSB (Trypticase Soy Agar) suplementado com 2% de glicose e 10 µL da suspensão de células de *S. aureus* (para diluir as células para 1×10^6 células por mL).

As estirpes após serem diluídas no TSB foram pipetadas em placas de 96 poços, sendo 200µL em cada poço, em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas com agitação. Logo após o biofilme foi lavado com 200µL de NaCl (0,9%) para remover as células na forma planctônica, este procedimento foi realizado duas vezes. Adicionou-se o hipoclorito de sódio nas concentrações de 150ppm e incubaram-se as placas a 37°C com agitação de 120rpm por 5, 10, 20 e 30 minutos. Logo após as células bacterianas foram lavadas com NaCl (0,9%), por duas vezes, e procedeu-se ao procedimento de contagem padrão em placas e o método do cristal violeta.

4.12.3 Contagem Padrão em Placas Para Bactérias Aderidas e Não Aderidas

O biofilme dos *S. aureus* nas microplacas foi lavado com 200µL de solução salina (NaCl, 0,9%). Em seguida adicionou-se mais 200µL de solução salina em cada poço para o procedimento de raspagem do biofilme com ponteiras de 200µL. A solução raspada, em triplicada de cada estirpe, foi colocada num microtubo tipo “*eppendorf*” para ser feita a sonicação (Ultrasonic Processor) durante 20 segundos numa amplitude de 22%. Após a sonicação as estirpes foram submetidas a um vórtex para homogeneização das estirpes de *S. aureus*. Foram feitas várias diluições (10^{-1} a 10^{-6}) para efeitos de

contagem em placas. Foi semeado 10µL de cada diluição, em triplicada, em placas de petri contendo meio TSA (Trypticase Soy Agar) pelo método da gota (adicionou-se três gotas separadas de 10µL no TSA e inclinou-se a placa para que estas escorram pelo meio). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Logo após foi feito a contagem das colônias existentes em cada placa e feito o cálculo para as diluições e expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Para as bactérias com adesão estática (não aderidas em biofilme), ou seja, duas horas de adesão, o procedimento foi o mesmo (GOMES, 2010).

4.12.4 Teste do Cristal Violeta (Microplacas)

As estirpes de *S. aureus* foram cultivadas individualmente, por uma noite, no TSB a 37°C e diluídas 1:200 no TSB contendo 0,25% de glicose. 200µL de células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo "U" e incubadas por 24 horas à 37°C com agitação. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) e logo após foi adicionado 200µL metanol para fixação e deixados até a secagem da placa, em torno de 15 minutos. Adicionou-se 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos, a seguir lavou-se as placas com água destilada e após estarem secas adicionou-se 200µL de ácido acético a 33% para ser feita a leitura a 570nm (Leitor de Elisa Tecan) (GOMES, 2010).

Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em triplicada e o teste foi repetido 3 vezes, sendo consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al. 2000).

4.12.5 Coloração de DAPI e Visualização da Eficiência do Hipoclorito de Sódio no Microscópio de Fluorescência

Com uma alça estéril uma colônia do *S aureus* foi semeada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) incubando a 37°C por 24 horas, em seguida, após as estirpes terem sido centrifugadas a 4°C por 9000 rpm durante 5 minutos. As estirpes foram lavadas com

NaCl (0,9%), e centrifugadas. Esse procedimento foi repetido, por duas vezes, e logo a seguir homogeneizou-se em vórtex e foi feita a leitura a densidade óptica (DO) a 640nm e acertado a concentração de 0,5. As estirpes foram pipetadas em tubos falcons contendo cupons de poliestireno (feitos com corte no fundo das placas de 6 poços) e incubados por duas horas a 37°C a 120rpm. Logo após a incubação os cupons foram lavados, uma vez, com NaCl (0,9%). Adicionou-se o hipoclorito de sódio a 150ppm. Cada cupon foi testado nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos e incubados a 37°C , 120 rpm. Logo após os cupons foram lavados com água destilada e secos. Adicionou-se o corante fluorescente DAPI (0,01%) nos cupons dentro dos tubos falcon. Os tubos falcons foram vedados com papel alumínio e colocados na estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida lavaram-se os cupons com água destilada para remover o excesso de corante. Deixou-se secar por 15 a 30 minutos. Os cupons foram observados no microscópio de fluorescência na objetiva de 100 em uma sala escura (GOMES, 2010).

4.12.6 Isolamento de Pró-fagos

O isolamento de pró-fagos foi realizado segundo Gutiérrez, et al. (2010). As estirpes de *S. aureus* foram semeadas em tubos falcon contendo meio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) por quatro horas para atingirem fase exponencial de multiplicação. Logo após foi adicionada a Mitomicina C (0,5µg/ml). As estirpes foram então incubadas a 37°C por três horas com agitação e logo após centrifugadas a 16.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante de cada estirpe foi filtrado em acrodiscos de 0,22µ e acondicionados em geladeira a 4°C.

Para testar a presença dos pró-fagos, as estirpes foram semeadas em meio BHI, em tubo falcon de 15 mL, e incubadas a 37°C por 24 horas. Em placas de petri contendo TSA, foi colocado 100µL de cada estirpe em placas diferentes (cada estirpe em uma placa), e adicionou-se uma segunda camada de Ágar TSA a 0,4%. Um volume de 10µL dos filtrados de cada estirpe foram adicionados na placa de petri após a solidificação da segunda camada de Ágar (Top Agar), sendo que cada um dos filtrados foram adicionadas em cada placa (totalizando 12 filtrados), em fileiras paralelas. O

objetivo deste teste foi de colocar todas estirpes contra todas para observar a presença de pró-fagos (visualizados por pequenas zonas de lise no local onde foi adicionada a gota). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e considerou-se supostamente positivo aquelas que possuíram regiões circulares de lise no local onde a gota foi adicionada, sendo necessária a propagação dos pró-fagos para confirmar a presença deles.

4.12.7 Propagação e Confirmação dos Fagos

Para confirmação das regiões circulares de lise como pró-fagos e também fagos possivelmente “líticos” foi necessária a realização da propagação dos fagos. Inicialmente as estirpes (conhecidas como hospedeiros) que obtiveram regiões de lise, foram semeadas em caldo BHI em tubos falcon de 15mL e incubados a 37°C por 24 horas. Logo após um volume de 100µL de cada estirpe (hospedeiro) foi colocada em placas de petri contendo Ágar TSA e juntamente com uma segunda camada de Ágar a 0,4%. As regiões circulares da placa contendo possível pró-fago foi cortada com um palito de madeira estéril e com este palito picou-se o Ágar contendo hospedeiro correspondente, formando duas fileiras de piques paralelas sobre a camada do Ágar. Com uma pinça estéril e papel estéril, a região do Ágar cortada foi tocada com papel (que estava na pinça) e toda a placa foi semeada com este papel, tomando-se o cuidado para não furar o Ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram considerados como pró-fagos as estirpes (hospedeiros) que obtiveram regiões circulares de lise propagadas por toda a região da placa onde foi semeado com o papel (GUTIÉRREZ et al. 2010).

4.12.8 Isolamento de Bacteriófagos

Para o isolamento de fagos possivelmente “líticos” buscou-se em uma propriedade leiteira de vacas holandesas na cidade de Braga, Portugal, excrementos contendo urina e fezes de vacas. Esses excrementos foram utilizados para tentativa de se isolar bacteriófagos líticos. Em um meio de TSB (Trypticase Soy Broth) duas vezes concentrado, adicionou-se a mesma proporção de excrementos contendo urina e fezes

de vacas, neste estudo foram utilizados 50mL de TSB duas vezes concentrado e 50mL de excremento das vacas, colocados juntos em dois vidros de “erlemeyer”, sendo 100mL de solução final em cada “erlemeyer”, juntamente a esses meios adicionou-se 100µL de seis estirpes (de 1 a 6) de *S. aureus* em um dos “erlemeyers” e 100µL de outras seis estirpes (7 a 12) de *S. aureus* noutro “erlemeyer”. Os “erlemeyers” foram fechados e incubados a 37°C por 48 horas com agitação de 120rpm.

Logo após foram retirados 10mL de cada “erlemeyer”, colocados em tubos falcons separados, e centrifugados por 10 minutos na rotação máxima e filtrados com acrodiscos de 0,22µ. O filtrado foi guardado em geladeira a 4°C.

Depois foi realizado o protocolo já descrito acima de propagação e confirmação para fagos. Para a confirmação do espectro lítico do fago só após outros testes tais como sequenciamento, microscopia de transmissão e outros testes mais específicos para que seja possível identificar a família e espécie de cada fago (AZEREDO & SUTHERLAND, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 856 vacas durante período de um ano, ao *Califórnia Mastitis Test* (CMT) sendo que destas, obteve-se 1086 (42,6%) dos tetos positivos ao CMT. A maior ocorrência das reações foi nos meses de Novembro, Janeiro, Junho e Julho. O CMT é um teste de triagem e deve ser acompanhado pelo teste microbiológico para confirmar a presença ou não do agente infeccioso.

Das amostras de leite das vacas, colhidas dos tetos reagentes ao CMT, 561 (51,67%) obtiveram multiplicação no meio de cultura Baird-Parker e 321 estirpes (57,2%) classificados nos testes bioquímicos como *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo os meses que apresentaram maiores taxas de isolamento foram Abril com 13,4%, seguidos dos meses de Março (9,6%), Dezembro (9,6%) e Julho (9,3%). Das amostras de leite do tanque de expansão foram isoladas 24 estirpes em meio Baird-Parker sendo que destas, 12 (50%) estirpes foram classificadas como *Staphylococcus*

coagulase positiva, tendo nos meses de Dezembro, Abril, Maio e Julho os maiores isolamentos.

Quanto a avaliação da presença de animais com mastite clínica foi possível observá-la em seis animais durante todo o período analisado, sendo estes casos separados para tratamento e para evitar a contaminação do leite dos outros animais que estavam sendo ordenhados.

Dos locais avaliados do ambiente de ordenha, já citados anteriormente, foram isoladas 167 estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivos, sendo que os pontos em que foram obtidos maior número de estirpes isoladas foram: Mangueiras, Insufladores, Saída do tanque de equilíbrio, Borracha do tanque de equilíbrio (transferidor), e os meses com maior número de isolamentos foram Abril (14,9%), Janeiro (14,9%) e Dezembro (10,1%), seguidos dos meses de Março (7,7) e Junho (7,7) respectivamente.

Ao avaliar as estirpes isoladas do ambiente de ordenha, do leite das vacas e do tanque de expansão os meses predominantes quanto aos isolamentos foram Março, Abril, Julho e Dezembro. Quando associa-se estas frequências com o CMT verifica-se que o único mês com maior número de tetos reagentes associado com maiores isolamentos foi o mês de Julho.

Das 500 estirpes isoladas bioquimicamente, 440 (88%) foram positivas no teste genotípico para identificação de *Staphylococcus aureus*, sendo 316 isoladas de leite de vacas com mastite subclínica, e leite do tanque de expansão. A maior frequência de isolamento para os isolados de leite de vacas foi nos meses de abril, dezembro e março, e para os isolados do leite do tanque de expansão, os meses de dezembro, abril, maio e julho (Tabela 1).

Dos pontos avaliados no ambiente de ordenha, foram confirmados com *S. aureus* 124 estirpes, nos quais as maiores frequências de isolamento ocorreram nos insufladores com 74 estirpes (59,7%), seguido das mangueiras com 21 (16,9%) e mãos-de-ordenhadores com 11 (8,9%). Os meses com maior frequência de isolamento foram janeiro, dezembro e abril. (Tabela 2).

As estirpes positivas para o gene Sa442, positivas para *S. aureus*, apresentaram tamanho de banda 108 pares de base visualizadas em gel de agarose após a reação em cadeia da polimerase (Figura 4).

MARTINS et al. (2010) estudaram a prevalência e etiologia infecciosa de casos de mastite bovina na região de Cuiabá e verificaram a prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina em propriedades leiteiras. Foram examinadas 108 vacas pertencentes a rebanhos desta microrregião. Em seguida, submeteram-se 279 amostras de leite provenientes de quartos mamários mastíticos a provas microbiológicas. Dos animais examinados, 85,2% foram portadores de mastite em pelo menos um quarto mamário. Dos quartos mamários afetados 65% dos quartos apresentaram mastite subclínica. Quanto à etiologia, nos casos de mastite subclínica os agentes causais mais isolados foram *Corynebacterium* spp. (27,6%) e *Staphylococcus aureus* (21,5%). Dentre os casos de mastite clínica foram isolados com maior frequência *S. aureus* (44,0%) e *Corynebacterium* spp.(12,0%).

FERREIRA, et al. (2008) estudaram 245 estirpes de *S. aureus* oriundas de casos de mastite bovina, insufladores e óstios papilares e observaram que o leite foi o sítio de isolamento que apresentou o maior número de isolados, com 150 (61,2%) estirpes. Consecutivamente, 65 (26,4%) e 30 (12,2%) estirpes de *S. aureus* foram isoladas do óstio papilar e dos insufladores, respectivamente. Em contrapartida, nenhuma estirpe foi isolada de lesões de pele do teto e de leite do tanque de expansão.

Observaram também que no período de fevereiro a setembro de 2006, concentraram-se a maioria (158) dos isolamentos de *S. aureus*, os quais corresponderam a 64,5% das estirpes estudadas. Dentre estas, 103 (65,2%) tiveram o leite como sítio de isolamento. Em contrapartida, nos meses de agosto e setembro de 2005 ocorreram as menores frequências de isolamento, quais sejam, 4 (1,6%) e 3 (1,2%) estirpes, respectivamente.

Na presente pesquisa o maior número de isolamentos de *S. aureus* também ocorreu no leite, 316 (71%) de 440 isolados, sendo destes 12 isolados do leite do tanque de expansão e 304 do leite de vacas com mastite, seguido dos insufladores 74 (16%), mangueiras 21 (4,7%) e mãos-de-ordenhadores 11 (2,2%). Os meses com maiores isolamentos foram abril, dezembro e março para os isolados de leite e para os

isolados de ambiente de ordenha janeiro, dezembro e abril. Um dos fatores que pode ter contribuído com significativa quantidade de matéria orgânica e umidade favorecendo uma maior proliferação dos micro-organismos é o índice pluviométrico. Verificou-se que na região de Minas Gerais que engloba as cidades de Uberlândia, Araguari e Iraí de Minas, estado de Minas Gerais, houve maior pluviosidade nos meses de dezembro de 2008 e janeiro de 2009, seguidos dos meses de fevereiro e março de 2009 (ANA, 2011).

Três situações que podem explicar a menor quantidade de micro-organismos foi a troca das borrachas dos insufladores realizada nos meses de setembro de 2008, fevereiro de 2009 e julho de 2009, a troca dos funcionários que trabalhavam na sala de ordenha realizada no mês de julho de 2009, e que um dos funcionários trabalhava na sala de ordenha desde o início das colheitas saiu no final do mês de abril de 2009, fato este que possa explicar uma grande quantidade de *S. aureus* isolados nas mãos deste ordenhador no mês de abril.

O controle e higienização na sala de ordenha foi realizado por uma sanitização com peróxido de hidrogênio 30 minutos antes do início da ordenha da tarde, um dos motivos que orientou a colheita dos suabes dos equipamentos da sala de ordenha após o término da ordenha, uma vez que antes do início da ordenha o sanitizante inibia a multiplicação bacteriana oriunda dos suabes que eram colocados no meio de cultivo no laboratório.

A linha de ordenha dos animais não era feita rigorosamente, sendo que em alguns meses, os animais reagentes ao CMT, com exame bacteriológico positivo eram colocados junto com animais sadios. Também não era realizada a higienização dos conjuntos de insufladores em solução contendo cloro (200ppm) ao passar de um animal para outro. Esta higienização passou a ser realizada em alguns meses, tais como setembro, outubro, novembro de 2008 após orientação técnica, mas não foi seguida rigorosamente devido a limitações de ordem prática, tais como aumento do tempo de ordenha, por ser mais uma medida adotada, e dificuldades em submergir os insufladores completamente na solução. Para que esta medida tenha efeito, a solução

desinfetante deve ser trocada cada vez que se apresentar turva, sendo que esta condição não foi seguida pelos funcionários inviabilizando assim o seu uso.

O *pré-dipping* e *pós-dipping* era realizado sempre, todos os dias, sendo que o *pré-dipping* continha uma solução de clorexidine (5%) e o *pós-dipping* uma solução de iodo glicerinado (5%). A desinfecção dos tetos depois da ordenha (*pós-dipping*) com desinfetante à base de iodo e dos insufladores da ordenhadeira sob imersão completa em balde com solução clorada (hipoclorito de sódio) são, segundo SANTOS & FONSECA (2007), medidas importantes para o controle da mastite. Outro fato que contribui para maior proliferação e contaminação dos equipamentos de ordenha é a formação de biofilmes nos mesmos, sendo ainda mais acelerada pela má ou inadequada higienização destes equipamentos.

Tabela 2: Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com o sítio de localização no ambiente de ordenha, leite de vacas e leite do tanque de expansão, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Data de Obtenção/Meses	Leite de Vacas	%	Leite do tanque de Expansão	%	Ambiente de Ordenha	%	Total
AG	19	100	0	0	-	-	19
SET	24	96	1	4	-	-	25
OUT	22	67	1	3	10	30	33
NOV	24	77	0	0	7	23	31
DEZ	31	67	2	4	13	28	46
JAN	24	50	1	2	23	48	48
FEV	22	67	0	0	11	33	33
MAR	29	78	0	0	8	22	37
ABR	37	71	2	4	13	25	52
MAI	22	73	2	7	6	20	30
JUN	22	69	1	3	9	28	32
JUL	28	70	2	5	10	25	40
AG	-	-	-		10	100	10
SET	-	-	-		4	100	4
Total	304	69	12	3	124	28	440

Legenda: (-) meses que não foram realizadas colheitas.

Tabela 3. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com o sítio de localização no ambiente de ordenha, em propriedade leiteira, no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Data Obtenção/ Meses	Insufladores		Mangueiras		Borracha Vácuo		Borracha Tanque equilíbrio		Saída Tanque equilíbrio		Superfície Tanque expansão		Mãos Ordenhadores		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Out	6	60,0	1	10,0	0	0,0	1	10,0	1	10,0	1	10,0	0	0,0	10	8,1
Nov	4	57,1	2	28,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	14,3	0	0,0	7	5,6
Dez	10	76,9	3	23,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	10,5
Jan	15	65,2	2	8,7	1	4,3	0	0,0	0	0,0	1	4,3	4	17,4	23	18,5
Fev	4	36,4	3	27,3	0	0,0	0	0,0	1	9,1	1	9,1	2	18,2	11	8,9
Mar	5	62,5	3	37,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	6,5
Abr	7	53,8	1	7,7	1	7,7	0	0,0	1	7,7	0	0,0	3	23,1	13	10,5
Mai	4	66,7	1	16,7	0	0,0	1	16,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	6	4,8
Jun	5	55,6	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	11,1	1	11,1	1	11,1	9	7,3
Jul	6	60,0	3	30,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	0	0,0	0	0,0	10	8,1
Ago	5	50,0	2	20,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0	1	10,0	1	10,0	10	8,1
Set	3	75,0	0	0,0	0	0,0	1	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	3,2
Total	74	59,7	21	16,9	2	1,6	4	3,2	6	4,8	6	4,8	11	8,9	124	100,0

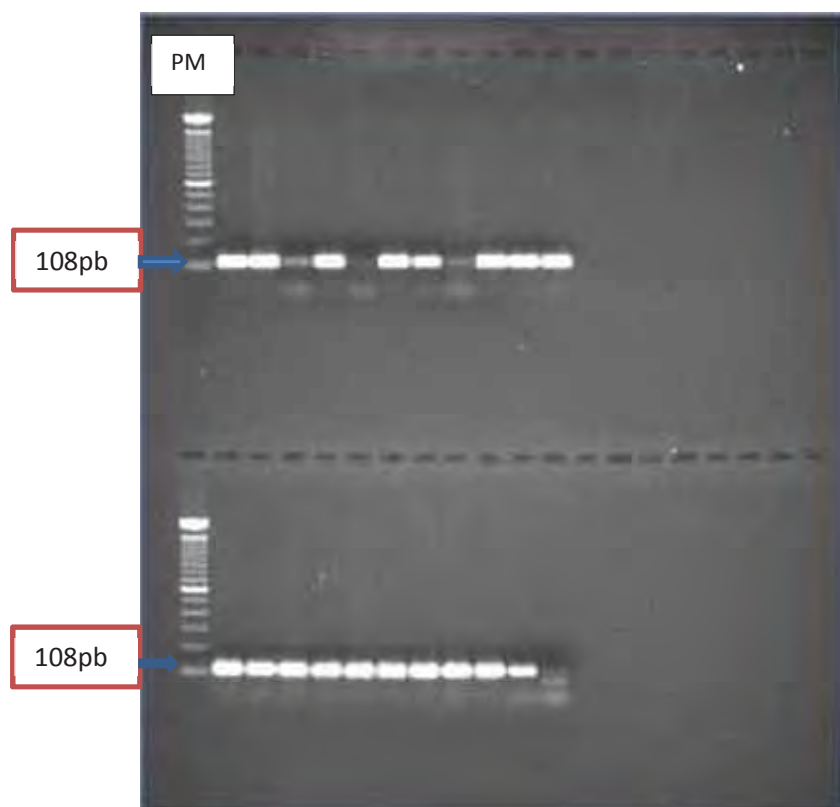


Figura 5: Eletroforograma do produto de PCR do gene *sa442*, DNA genômico de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 108pb. PM: peso molecular.

FREEMAN, et al (1989) desenvolveram um método alternativo com alta especificidade para determinar a produção de biofilmes em estafilococos coagulase negativos, conhecido como “Ágar Vermelho Congo” (CRA). Este método se baseia no princípio da utilização de um corante em meio sólido (Ágar) com adição de sacarose para propiciar a produção de biofilmes. As bactérias produtoras de biofilme produzem uma pigmentação preta e as negativas uma pigmentação vermelha. A atuação do corante apesar não estar bem elucidada pelo autor, o mesmo sugere que o mecanismo de ação seria que durante as fases de incubação, na qual ocorrem as mudanças de cor com a produção de um produto secundário durante as mudanças de fase bacteriana. A escolha do corante foi devido a outros experimentos, nos quais foi possível visualizar o exopolissacarídeo em micro-organismos aquáticos gram negativos.

Os resultados das análises fenotípicas quanto à produção de biofilme no Agar Vermelho Congo (CRA) revelaram que de 316, 251 (79,4%) isolados de leite de vacas e tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*” e 65 (20,6%) destes não foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*”, enquanto que das 124, 111 (89,5%) estirpes isoladas de diversos pontos no ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme. Foi possível observar a formação de biofilme em estirpes isoladas tanto do leite de vacas com mastite e leite do tanque de expansão, quanto do ambiente de ordenha. Esses dados permitem justificar ainda mais, a importância da higienização dos equipamentos de ordenha, a fim de se evitar, a multiplicação microbiana com conseqüente formação de biofilmes e levando não só a perda material do equipamento quanto à contaminação constante do leite que passa por estes equipamentos (Tabela 3).

JAIN & AGARWAL (2009) avaliou a produção de biofilmes em estirpes de estafilococos patogênicas e não patogênicas. Verificaram que a produção de biofilmes foi de 74% e 32% para as estirpes patogênicas e não patogênicas respectivamente. Verificaram também que o teste do Ágar Vermelho Congo demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 90% para os *S.aureus*.

BERNADI, et al. (2010), compararam estirpes de estafilococos coagulase negativas isoladas de pacientes hospitalares a fim de se avaliar a produção de biofilme pelos testes de PCR, CRA, teste de tubo e Mtp. Observaram que de 100 isolados estudados, 82% foram positivos no PCR, 82% no teste de tubos, 81% no Mtp e 73% no CRA. MELO (2008) avaliando estirpes de *S. aureus* oriundos de casos de mastite bovina também observou uma melhor concordância do teste de microplacas com PCR para genes *ica* do que o teste do CRA quando comparado com as análises moleculares.

Os *S.aureus* foram também avaliados fenotipicamente quanto à produção de biofilme no Teste de Microplacas (Mtp). Os resultados das análises revelaram que das 313, 263 (84%) dos isolados de leite de vacas e do leite do tanque de expansão foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*” e 50 (16%) destes não foram capazes de produzir biofilme “*in vitro*”, enquanto que 108 de 127 (85%) das estirpes isoladas do ambiente de ordenha foram produtoras de biofilme (Tabela 4).

Na presente pesquisa, tanto o CRA quanto o Mtp, apresentaram valores próximos para detecção de biofilmes em isolados de *S. aureus*. Ao analisar os dois testes fenotípicos verificou-se que, os dois testes obtiveram bons resultados para identificar a produção de biofilme, conseguindo detectar 80% desta produção. Quando as estirpes foram analisadas separadas verificou-se que, para as estirpes isoladas de leite de vacas e leite do tanque de expansão a produção de biofilmes pelo teste de microplacas foi ligeiramente superior do que a produção pelo CRA. Para as estirpes isoladas de ambiente de ordenha o teste do CRA foi ligeiramente superior que o teste de microplacas. Quando avaliadas em conjunto verificou-se que as estirpes isoladas do ambiente tiveram maior facilidade em produzir biofilme “*in vitro*” do que as estirpes isoladas do leite, porém as diferenças foram muito pequenas sendo que estes dois testes não demonstram diferença estatística significativa ($\alpha < 0,05$) para definir se as estirpes de ambiente realmente produzem mais biofilme do que os isolados de leite. Pode-se ser melhor explicar, pelo comportamento das estirpes e das diferenças

genéticas para processo de adesão e formação de biofilmes para bactérias isoladas de ambiente e de leite, dados estes também relatado por outro autor (FOX, et al. 2005).

Com as 440 estirpes de *S. aureus* isoladas foi realizada a técnica de PCR para avaliação dos genes envolvidos no processo de formação do biofilme, sendo eles: *icaA*, *icaD*, *bap*, *agrA*, *agrC*, *agrB,D*, *hdi*, *hla*, *clafA*, *clafB*, *tsst-1* e *sarA*. Os genes que apresentaram maior prevalência foram: *hla*(99%); *clafB* (99%),*clafA*(98%); *agrA*(98%) *sarA*(97%); *icaD*(97%), *icaA*(90%); *bap*(87%). Estes resultados sugerem que o gene *ica* envolvido na adesão intercelular não foi o mais prevalente apesar da sua associação altamente positiva na formação de biofilme. (VASUDEVAN, et al. 2003; MELO, 2008; OLIVEIRA, et al. 2010). Outros genes relacionados também a outros fatores de virulência como o *clafA*, *B* e o *hla* mostraram neste estudo uma maior prevalência, podendo estes genes também serem importantes tanto na formação quanto no processo de manutenção dos biofilmes (Gráfico 1), (Figuras de 6 a 9; e de 13 a 15).

MELO (2008) comparando a presença do gene *ica* com a produção de biofilmes pelos testes do CRA e Mtp verificou que alguns isolados de *S. aureus* que não possuíam gene *ica* foram capazes de produzir biofilmes, fato este que pode ser explicado na presente pesquisa sobre a importância de outros genes, tais como *clfA*, *clfB* e *hla*, associados com a produção de biofilme e com maior frequência de isolamento que os produtos do genes *icaA* e *icaD*.

Do complexo *agr* que são os genes responsáveis pelo processo de comunicação celular no biofilme o mais prevalente foi o *agrA*, informação esta que também já foi relatado por outro autor (TAKEUCHI, et al. 2001). O gene relacionado à produção de enterotoxina do choque tóxico *tsst* foi o menos freqüente, dados também relatados por outros autores (CUNHA, et al. 2007; FERREIRA, et al. 2008) gene este que apresenta uma relação de expressão da produção de toxina aumentada quando na presença de outros genes da formação de biofilme, tais como o complexo de genes *agr* (Figuras de 10 a 12).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu a visualização das estirpes de *S. aureus* aderidas aos cupons de aço inoxidável oriundas tanto de pontos no ambiente de ordenha como também do leite de vacas com mastite subclínica, além de

permitir visualizar também a camada de exopolissacarídeos entre as células de estafilococos (Figuras de 16 a 20).

SANTOS (2009) estudando a formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável por estirpes de estafilococos coagulase negativas e positivas em uma usina de beneficiamento do leite observou que isolados do tanque de estocagem do leite cru antes da higienização e após a higienização, assim como isolados do tanque de leite pasteurizado antes da higienização e isolados da máquina de envase do leite antes e após a higienização, foram capazes de produzir biofilme, visualizados pela microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a presença de falhas no processo de higienização na referida indústria.

Na presente pesquisa foi também possível observar a formação de biofilmes nas superfícies de aço inoxidável como também em umas das borrachas utilizadas na sala de ordenha. Entre as borrachas analisadas pela microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar a formação de biofilme misto (cocos, bacilos e hifas) interagindo dentro de uma matriz de exopolissacarídeos na borracha da tampa do tanque de equilíbrio. Esta borracha estava sendo utilizada por um período superior a 12 meses, possuía um corte de aproximadamente 3 cm e entrava em contato com o leite do tanque de equilíbrio. Já nas borrachas dos insufladores não foi possível visualizar as células bacterianas aderidas, mas foi possível observar desgaste das borrachas, presença de fissuras e resíduos de proteínas e gorduras, sendo este o ambiente favorável para a adesão de células e formação de biofilmes (Figura 19).

ZOLTAI, et al. (1981) demonstraram que, ao elevar o tempo de contato do micro-organismo com a superfície, o número de células aderidas, o tamanho da microcolônia e o grau de adesão também aumentam. Além disto, ocorre o incremento da resistência a sanificantes. Assim sendo, a quantidade de células aderidas poderia ser variada caso trabalhássemos com maior ou menor tempo de incubação. Isso mostra a importância de serem feitos intervalos para higienização após um período de 6 a 8 horas de processamento, pois pode haver um número significativo de bactérias aderidas ao equipamento e as células aderidas no início do período de trabalho podem apresentar maior resistência ao processo de higienização.

Estes trabalhos citados e a atual pesquisa ressaltam a importância do processo de higienização, dos intervalos e do tempo de contato das superfícies do ambiente de ordenha com os sanitizantes e da troca periódica das borrachas, considerando o tempo de uso e desgastes das mesmas, sendo estes fatores importantes e decisivos para que os micro-organismos possam aderir, colonizar e constituir os biofilmes.

Assim como constatado por MARQUES (2005), neste estudo também pode ser observado, pelas eletromicrografias da microscopia eletrônica de varredura, que os insufladores analisados pela MEV possuíam ranhuras que permitiam às bactérias se alojarem e iniciarem sua multiplicação (Figura 20). Neste sentido, sabe-se que o aumento de irregularidades nesta superfície proporciona o aumento no número de micro-organismos aderidos de modo a possibilitar a formação do biofilme.

Tabela 4 – Resultados da avaliação da habilidade de produção de biofilmes no Ágar Vermelho Congo (CRA) por estirpes de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no Município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Data de Obtenção Meses	<i>S. aureus</i> isolados do Leite Positivo no CRA	%	<i>S. aureus</i> isolados do Ambiente de Ordenha Positivos no CRA	%	<i>S. aureus</i> isolados do Leite Negativo no CRA	%	<i>S. aureus</i> isolados do ambiente de ordenha Negativo no CRA	%	Total
AG	19	100	-	-	0	0	-	-	19
SET	23	92	-	-	2	8	-	-	25
OUT	22	66	10	30	1	3	0	0	33
NOV	17	54	7	22	7	22	0	0	31
DEZ	19	41	11	23	14	30	2	4	46
JAN	12	25	21	40	13	27	2	4	48
FEV	18	54	10	30	4	12	1	3	33
MAR	17	49	7	18	12	32	1	2	37
ABR	39	75	13	25	0	0	0	0	52
MAI	23	76	6	20	1	33	0	0	30
JUN	21	65	5	15	2	6	4	12	32
JUL	21	52	7	17	9	22	3	7	40
AG	-	-	10	100	-	-	0	0	10
SET	-	-	4	100	-	-	0	0	4
Total	251	57	111	25	65	14	13	29	440

Leite: Leite de vacas e leite do tanque de expansão; Ambiente de ordenha: Insufladores, Mangueiras, Borracha do vácuo, Borracha da tampa do tanque de equilíbrio, Saída do tanque de equilíbrio, Superfície do tanque de expansão. (-) Não foram realizadas colheitas.

Tabela 5 - Resultados da avaliação da habilidade de produção de biofilmes no Teste de Microplacas (Mtp) por estirpes de *Staphylococcus aureus* oriundas de leite e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no Município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Data de Obtenção Meses	<i>S. aureus</i> isolados do Leite Positivos no Mtp	%	<i>S. aureus</i> isolados do ambiente de ordenha Positivos no Mtp	%	<i>S. aureus</i> isolados do Leite Negativos no Mtp	%	<i>S. aureus</i> isolados do ambiente de ordenha Negativos no Mtp	%	Total
AG	17	89	-	-	2	10	-	-	19
SET	15	6	-	-	10	40	-	-	25
OUT	10	30	5	15	13	39	5	15	33
NOV	18	58	3	9	6	19	4	12	31
DEZ	18	39	10	21	12	26	6	13	46
JAN	20	41	20	41	5	10	3	6	48
FEV	22	66	11	33	0	0	0	0	33
MAR	29	78	8	21	0	0	0	0	37
ABR	39	75	13	25	0	0	0	0	52
MAI	24	80	6	20	0	0	0	0	30
JUN	23	71	9	28	0	0	0	0	32
JUL	28	70	10	25	2	5	0	0	40
AG	-	-	9	90	-	-	1	10	10
SET	-	-	4	100	-	-	0	0	4
Total	263	60	108	25	50	11	19	4	440

Leite: Leite de vacas e leite do tanque de expansão; Ambiente de ordenha: Insufladores, Mangueiras, Borracha do vácuo, Borracha da tampa do tanque de equilíbrio, Saída do tanque de equilíbrio, Superfície do tanque de expansão. (-) Não foram realizadas colheitas.

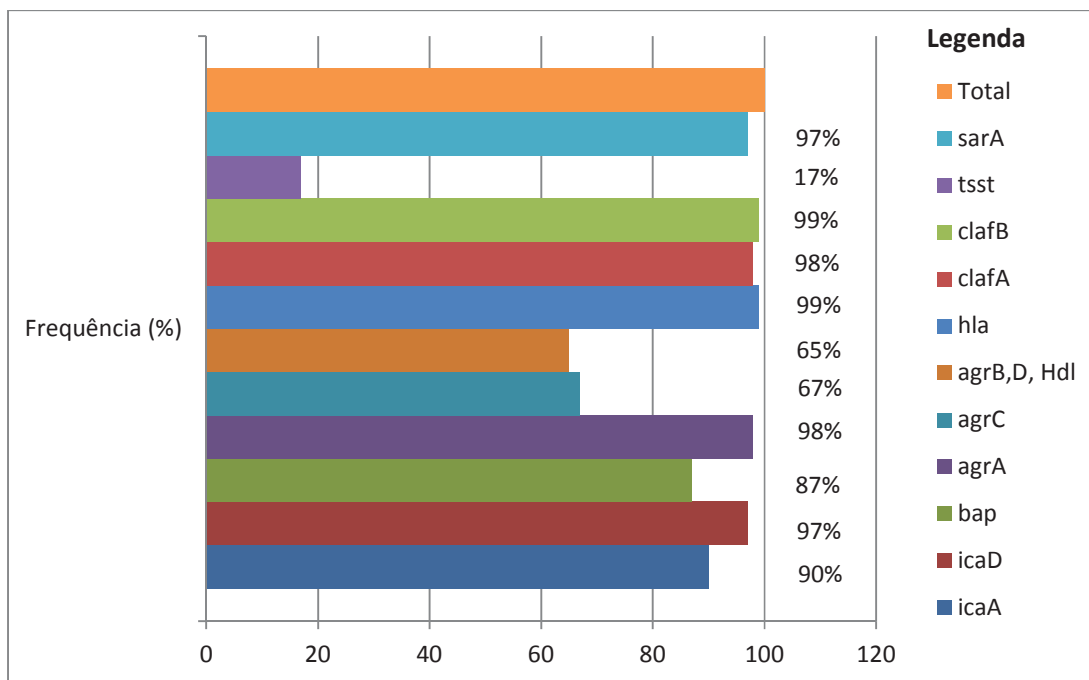


Gráfico 1 – Análise Genotípica quanto a Presença dos Genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *agr*, *hdi*, *hla*, *clafA*, *clafB*, *tsst-1* e *sarA* de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados do leite e do ambiente de ordenha de propriedade leiteira no Município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

TAKEUCHI et al (2001) estudando a variação do operon *agr* em estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina observou que os produtos dos genes *agrA* e *agrC* estiveram presentes em 100% dos isolados enquanto que os produtos dos genes *agrBD* e *hdi* foram encontrados em diferentes proporções de 86% a 97%. Na presente pesquisa os produtos do gene *agrA* foram encontrados em 98% das estirpes enquanto que, os produtos dos genes *agrC* e *agrBD,hdi* foram encontrados nas proporções de 67% e 65% respectivamente. O produto do gene *agrA* obteve maior frequência de isolamento e junto com outros genes associados a produção de biofilme, indicando ser importante nos processos de adesão e formação de biofilmes além de regular outros fatores de virulência como exemplo a síndrome do choque tóxico (TSST) que no presente estudo, o produto do gene responsável (*tsst*) ocorreu em 17% dos isolados.

A simples presença de genes enterotoxigênicos não indica, necessariamente, a capacidade do micro-organismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas (MCLAUHLIN et al. 2000). No entanto, o simples fato de uma estirpe conter um ou mais genes enterotoxigênicos deve ser significativo, pois pode oferecer risco a Saúde Pública caso encontre condições favoráveis a produção de enterotoxinas.

A presença do produto do gene *bap* juntamente com o produto do gene *ica* foi estudada em isolados de *S.aureus* oriundos de casos de mastite bovina, sendo que 94% de 195 isolados foram positivos para gene *ica* e 25% para gene *bap*. Ao associar os dois genes observou-se que todos os isolados que possuíam gene *ica* também possuíam gene *bap*. Aqueles isolados que não possuíam gene *ica* mas possuíam gene *bap* foram fortes produtores de biofilmes. Assim, concluiu-se que a presença do gene *bap* está associada com a formação de biofilme e persistência do *S. aureus* na glândula mamária (CUCARELLA et al. 2001, 2004).

Na presente pesquisa as estirpes de *S. aureus* apresentaram genes *icaA*, *icaD* e *bap* em 90%, 97% e 87% dos isolados sendo que nas estirpes que não possuíam gene *ica* mas possuíam gene *bap* e vice-versa ocorreu a produção de biofilme. Assim como em pesquisas por outros autores a ausência de um gene foi compensada pela presença de outro.

Outro gene importante relacionado com a adesão das bactérias em biofilme é o fator de adesão (*clumping factor*) cujos genes *clfA* e *clfB* codificam fatores que ligam os micro-organismos às células em infecções, principalmente na presença de fibrinogênio decorrente de processos inflamatórios (EIDHIN et al. 1998; YOK-AI QUE et al. 2001; WOLZ et al. 2002).

A presença dos produtos dos genes *clfA* e *clfB*, na presente pesquisa, nas estirpes de *S. aureus* isolados de casos de mastite e ambiente de ordenha reforça ainda mais a importância de evitar que os micro-organismos colonizem e possam aderir às superfícies, principalmente nos casos de mastite onde a presença da reação inflamatória e consequente formação de fibrinogênio auxilia na manutenção da bactéria nos alvéolos e a consequente formação de biofilmes; 98% e 99% dos isolados de *S.*

aureus possuíam os genes *clfA* e *clfB*, fato este que pode ser associado a permanência dos micro-organismos por todo o ano no ambiente de ordenha e nos animais avaliados.

O gene acessório regulador dos estafilococos (*sar*) controla vários fatores de virulência dos estafilocos e muitos estudos demonstram que este operon é essencial no processo de formação dos biofilmes. Estudos com mutantes destes genes nos estafilococos relataram uma queda da produção do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA), prejudicando o desenvolvimento do biofilme tanto em sistemas estáticos (ausência de fluxo) quanto em sistemas de fluxo (Ex: biorreatores). Verificou-se que o *sarA*, um dos genes pertencentes ao operon *sar*, regula o operon *ica* na produção do PIA (VALLE et al. 2003).

Outros estudos evidenciam a regulação positiva do *sarA* na expressão de proteínas da parede celular bacteriana que também estão associadas aos genes do “clumping factor” (SAID-SALIM et al. 2003; CHEUNG et al. 2008).

Neste trabalho o produto do gene *sarA* esteve presente em 97% das estirpes, sendo assim ressalta-se a importância deste gene no processo de regulação dos mecanismos de formação de biofilme e o cuidado no estudo dos mecanismos de prevenção de produção de vacinas e medicamentos baseados apenas no estudo do gene *ica*, sendo o operon *sar* o principal regulador do gene *ica*.

A alfa-toxina dos estafilococos é uma proteína de 34K-Da secretada extracelularmente pelos estafilococos durante a fase de multiplicação estacionária. Esta proteína foi documentada como fator de virulência em infecções tais como mastite, ceratites, peritonites (BAYER et al. 1997). Entretanto o papel fundamental desta alfa-toxina ainda não está bem definido.

Outros trabalhos têm relatado a atividade citolítica que essa toxina tem nas células da glândula mamária (BHAKDI & JENSEN 1991, SONG et al. 1996) e estudos em ratos com mutantes deficientes para este gene reduziram sua virulência “*in vivo*” (BAYER et al. 1997). Considerando a importância deste gene na patogenicidade dos casos de mastite, e este produto do gene encontrado com maior frequência no presente trabalho, sendo 99% dos isolados positivos e sua associação aos genes de biofilme, se faz necessário mais estudos sobre esta toxina e este gene como candidatos alvos na

produção de vacinas ou moléculas para tratamento de mastites e outras infecções associadas aos estafilococos.

O perfil genético e molecular das estirpes estudadas permitem reforçar as medidas de prevenção e também utilizar estas informações em futuras pesquisas para diminuir ou até mesmo ter o efetivo controle destas infecções por meio das vacinas.

Prancha 1

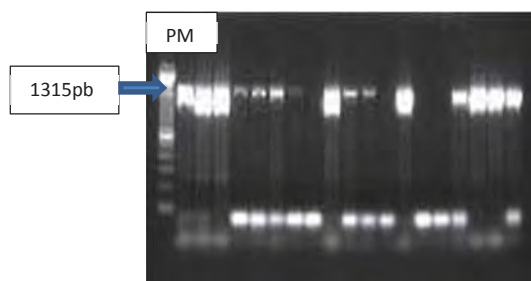


Figura 6

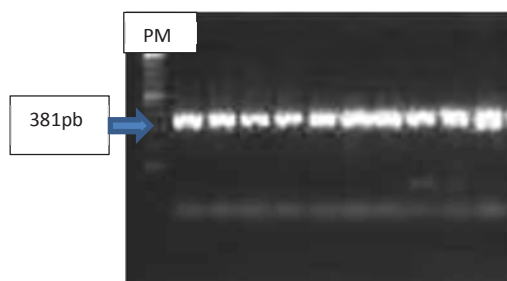


Figura 7

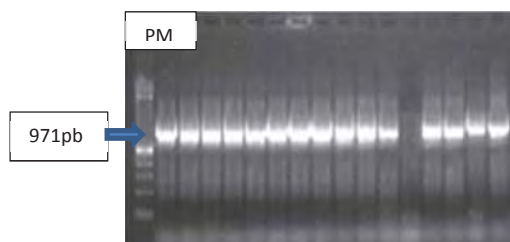


Figura 8

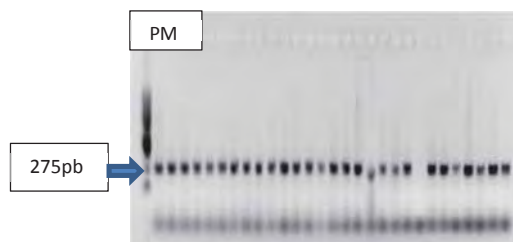


Figura 9

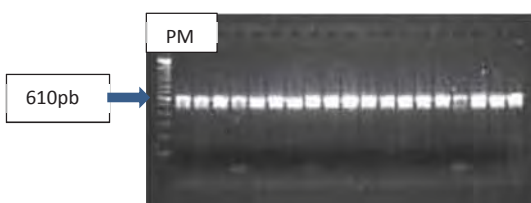


Figura 10

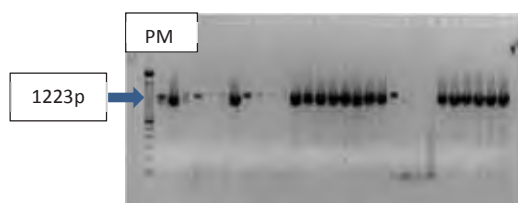


Figura 11

Figura 6: Eletroforograma do produto de PCR do gene *icaA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1315pb. PM: peso molecular.

Figura 7: Eletroforograma do produto de PCR do gene *icaD*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 381pb. PM: peso molecular.

Figura 8: Eletroforograma do produto de PCR do gene *bap*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 971pb. PM: peso molecular.

Figura 9: Eletroforograma do produto de PCR do gene *sarA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 275pb. PM: peso molecular.

Figura 10: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 610pb. PM: peso molecular.

Figura 11: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrC*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1223pb. PM: peso molecular.

Prancha 2

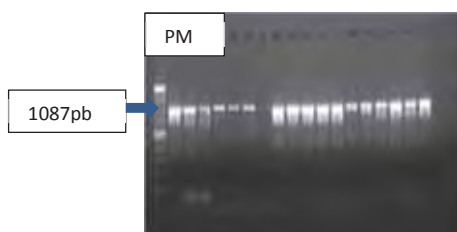


Figura 12

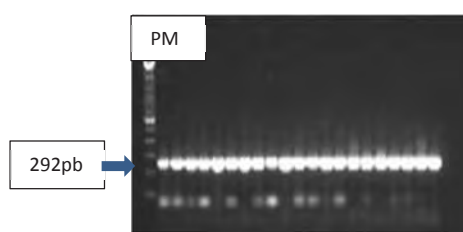


Figura 13

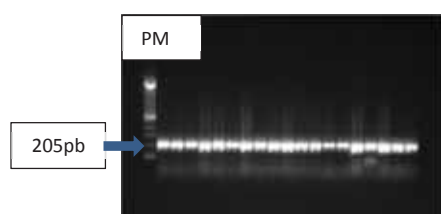


Figura 14

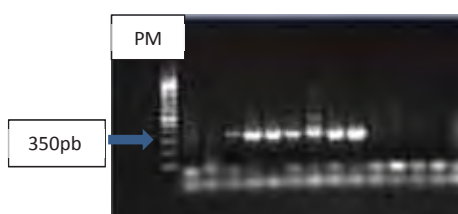


Figura 15

Figura 12: Eletroforograma do produto de PCR do gene *agrBD, hdl*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 1087pb. PM: peso molecular.

Figura 13: Eletroforograma do produto de PCR do gene *clfA*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 292pb. PM: peso molecular.

Figura 14: Eletroforograma do produto de PCR do gene *clfB*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 205pb. PM: peso molecular.

Figura 15: Eletroforograma do produto de PCR do gene *tsst-1*, DNA cromossomal de isolados de *Staphylococcus aureus* visualizados em gel de agarose por meio de bandas de tamanho de 350pb. PM: peso molecular.

Prancha 3

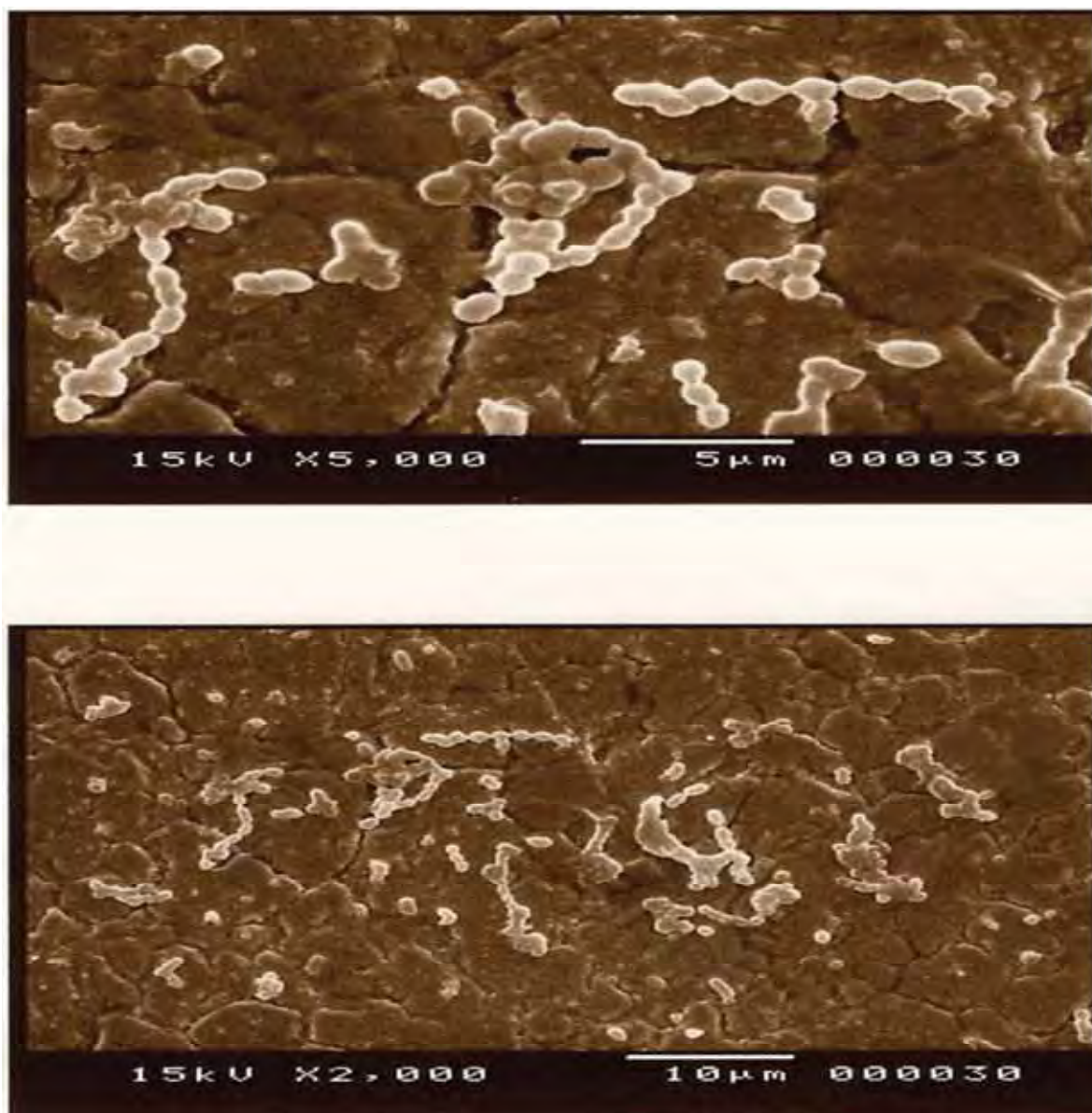


Figura 16. Biofilme formado em cupons de aço por *S. aureus* isolados de insufladores

Prancha 4

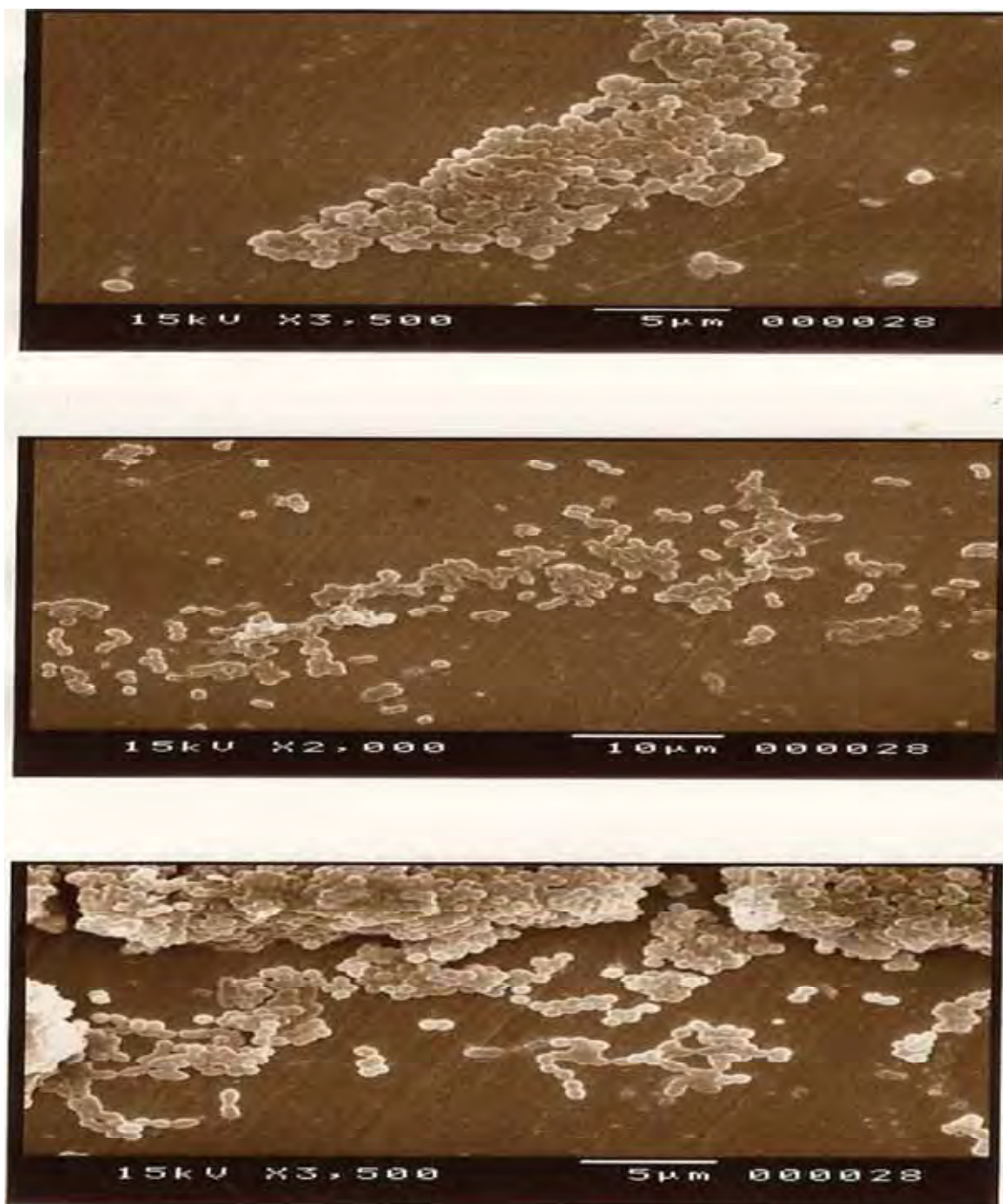


Figura 17. Biofilme de *S. aureus* oriundos de mangueiras condutoras de leite visualizado por MEV em cupons de aço

Prancha 5

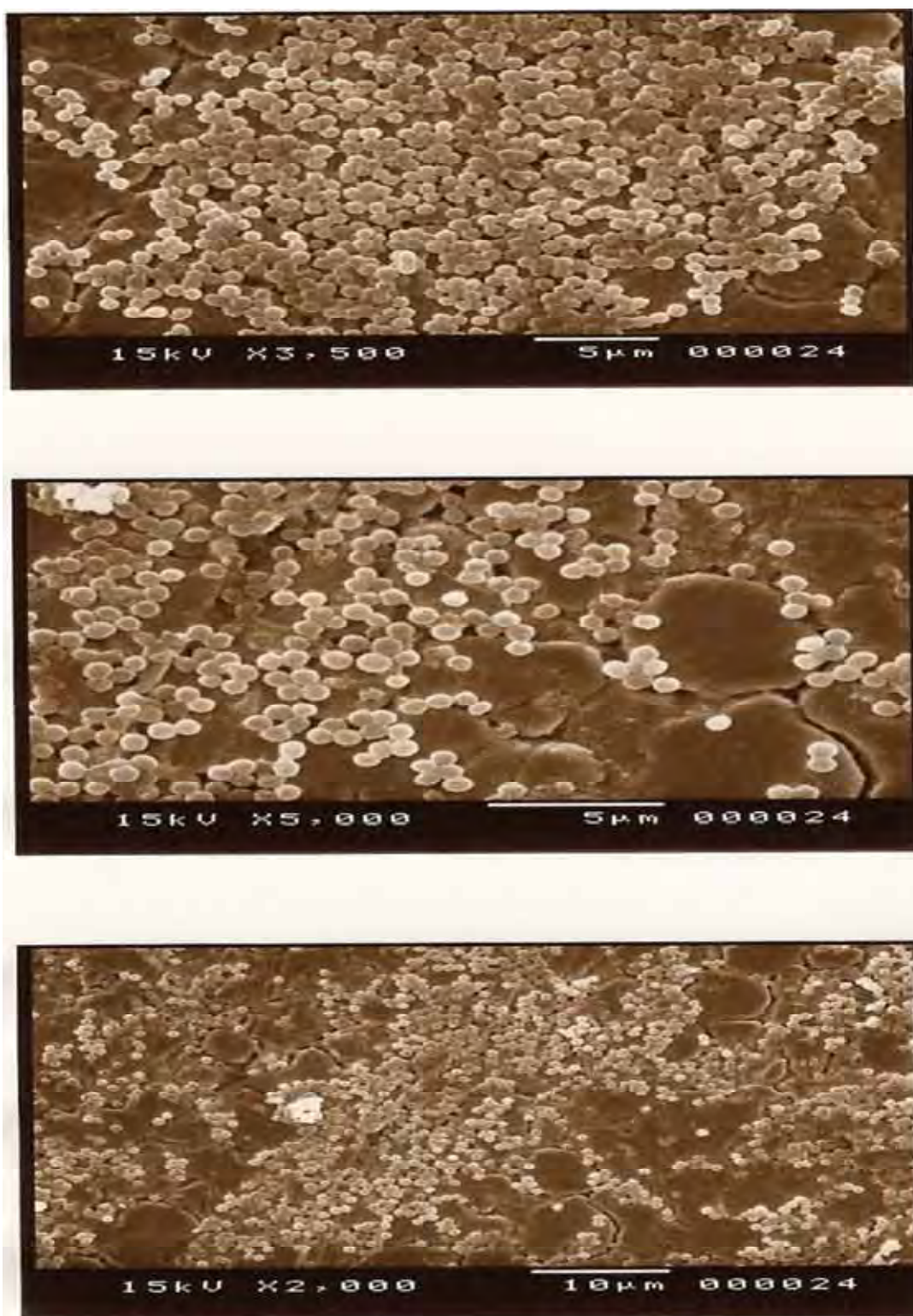


Figura 18. Biofilme de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica visualizados em cupons de aço por MEV.

Prancha 6

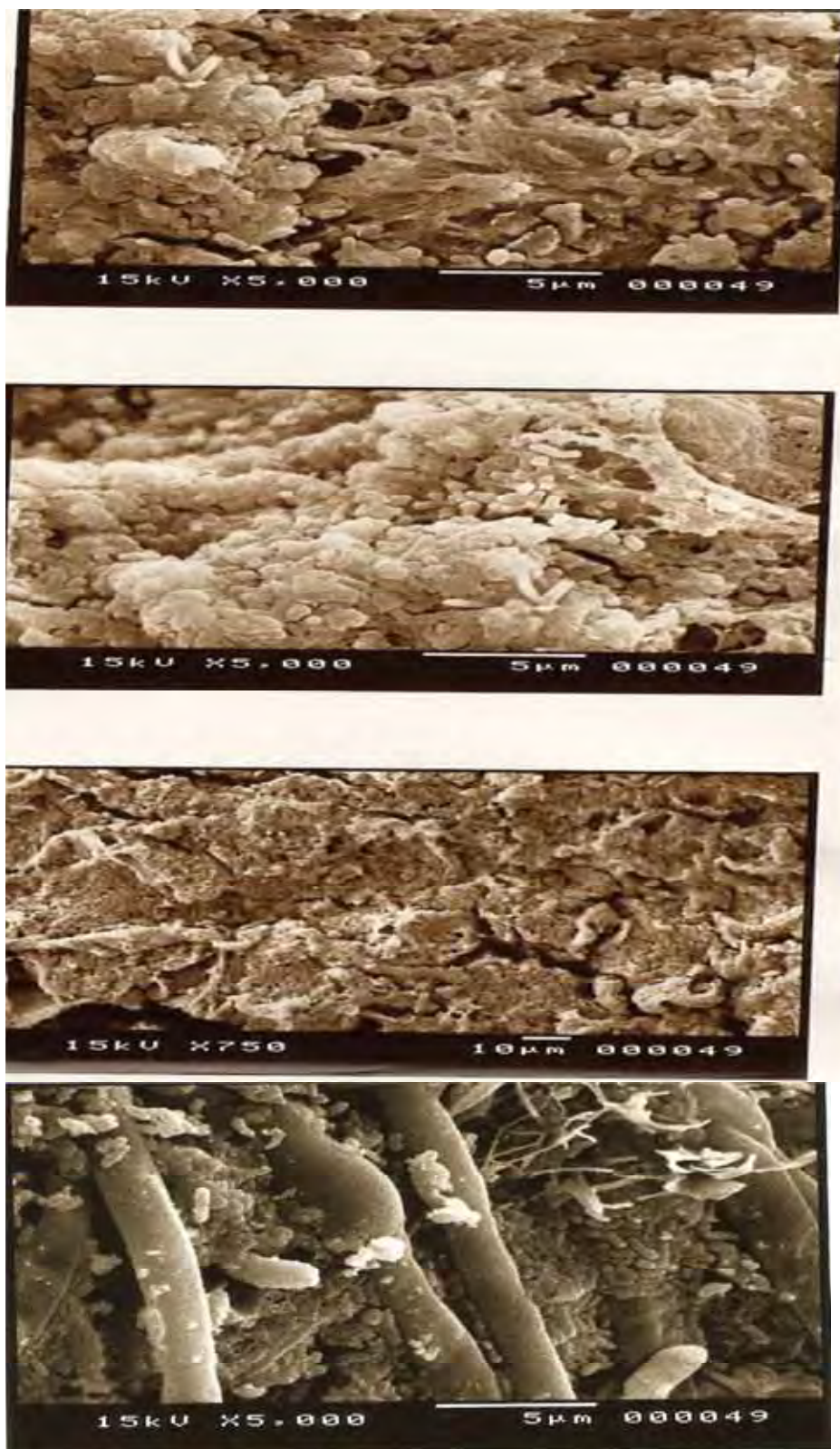


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura realizada em borracha de silicone que era utilizada na tampa do tanque de equilíbrio do leite na sala de ordenha, demonstrando a formação de biofilme misto com a presença de bacilos, cocos e hifas.

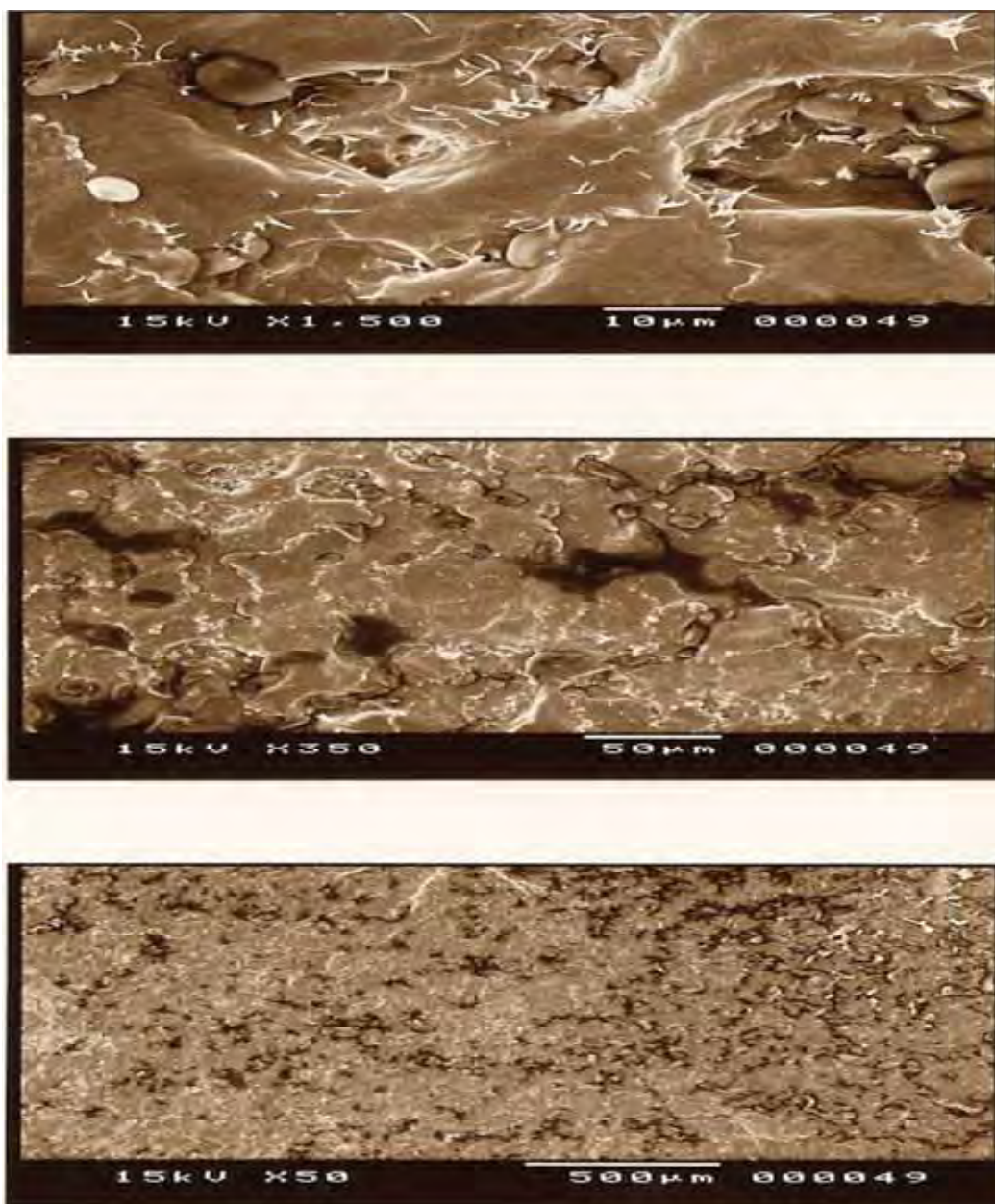


Figura 20. Borrachas de látex dos conjuntos de insufladores utilizadas por um período de 3 meses demonstrando o desgaste e a presença de fissuras com depósitos de resíduos de leite.

As Figuras 16, 17, 18, e 19 possibilitam visualizar, por meio das eletromicrografias, em cupons de aço, a presença de células de *S. aureus* e da matriz de exopolissacarídeos, constituinte dos biofilmes, isoladas de insufladores, mangueiras condutoras de leite,

borracha do tanque de equilíbrio, e do leite de vacas com mastite subclínica. As estirpes depois de isoladas e identificadas entraram em contato com as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme.

Das 440 estirpes de *S. aureus* isoladas 225 (51.13%) foram avaliadas na eletroforese de campo pulsado (PFGE). Nas outras 215 estirpes testadas no PFGE não foram possíveis visualizar o perfil eletroforético. Alguns exemplos dos produtos amplificados obtidos na análise dos géis da PFGE estão apresentados na Figura 21.

Com a análise de agrupamento foi possível classificar as estirpes de *S. aureus* em 70 grupos. A classificação dos pulsotipos consta do dendrograma (Apêndice) de acordo com o estabelecido por Tenover et al (1997), os quais estabelecem que, as amostras de 75% a 80% de similaridade são agrupadas como mesmo pulsotipo.

Nas Tabelas 6a e 6b estão apresentados os 70 padrões distintos encontrados para as 225 estirpes de *S. aureus* e 1 cepa de *S. aureus* totalizando 226 estirpes de acordo com a origem das amostras provenientes de uma propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG.

Dos 70 pulsotipos encontrados, foram prevalentes os pulsotipos 35, 33 e 60 com 4%, 3,5% e 3,5% respectivamente. Dos pontos investigados nesta pesquisa, os locais que obtiveram maior quantidade de perfis clonais diferentes foram: leite de vacas com mastite (67%) e Conjunto de Insufladores (21%) e mãos-de-ordenhadores (3,5%).

A variabilidade genética dos perfis clonais encontrados na propriedade leiteira já relatada na presente pesquisa, permite inferir a presença de 3 pulsotipos predominantes, e uma grande variabilidade de pulsotipos no leite associados com diversos pontos no ambiente de ordenha. Dois fatos que chamam a atenção na sala de ordenha são: o conjunto de insufladores e as mãos-de-ordenhadores como pontos do ambiente de ordenha com maior isolamento distintos de perfis clonais, sugerindo que houve uma falha no processo de higienização e manutenção dos equipamentos da ordenhadeira mecânica, higiene pessoal, manejo dos animais e constituição de uma linha correta de ordenha o que evitaria a disseminação destes pulsotipos nos insufladores e outros pontos do ambiente de ordenha.

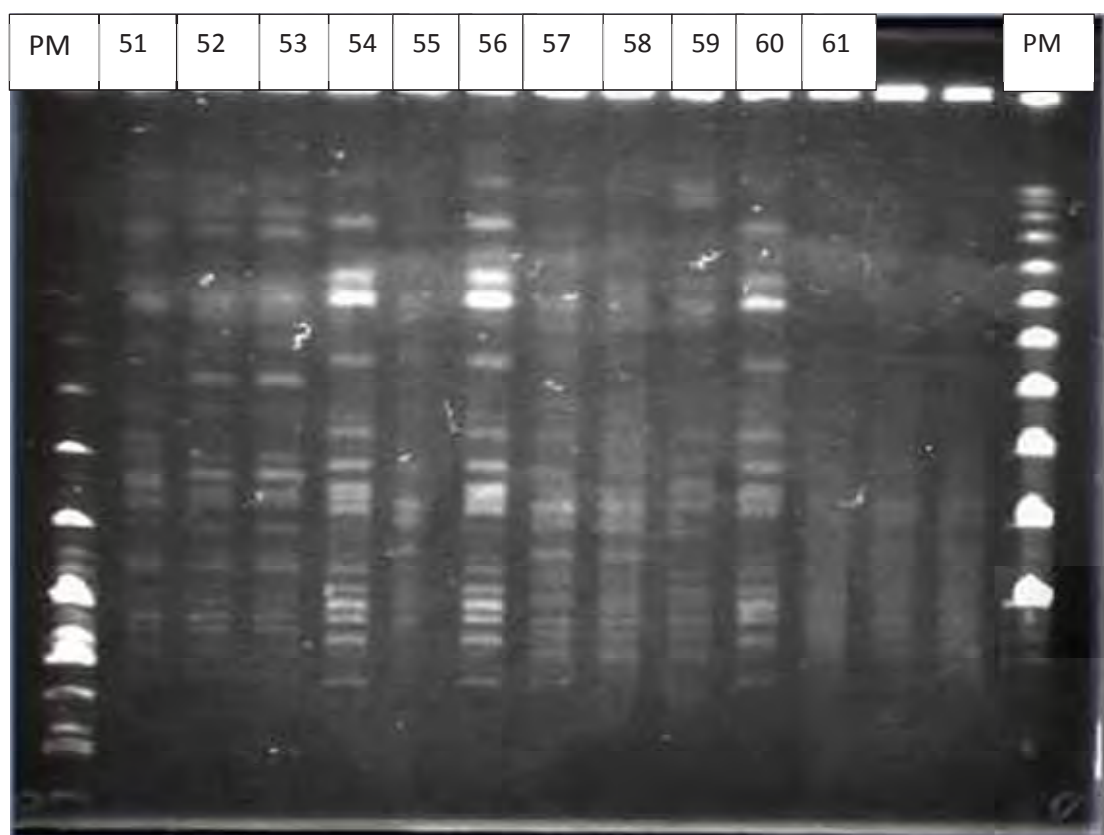


Figura 21: Exemplos de padrões de restrição do DNA genômico das estirpes de 51 a 61 de *Staphylococcus aureus*, submetidas à PFGE. PM: Peso molecular.

No ambiente de ordenha, existem dois locais entre aqueles que foram pesquisados que também alertam e preocupam que são: borracha do tanque de equilíbrio (BTE) e a borracha do vácuo (BV). Na BTE foi obtido um pulsotipo associado a um segundo pulsotipo cuja origem foi a superfície do tanque de expansão. Na borracha do vácuo 2 pulsotipos associados a mão-de-ordenhadores e saída do tanque de equilíbrio foram encontrados, sendo assim, a preocupação com a higienização das mãos é muito discutida em trabalhos com mastite e manipulação de leite e alimentos. Esse trabalho só reforça como as mãos podem funcionar como fonte de infecção e também transmissão de patógenos permitindo a circulação e permanência destes patógenos no ambiente de ordenha. A borracha do vácuo, é um dos pontos dentro do

ambiente de ordenha que muitas vezes não é investigada, nem é dada a importância que merece podendo assim ser um foco de contaminação para os outros equipamentos e conseqüentemente para o leite que entra em contato com o mesmo. Assim também a borracha da tampa do tanque de equilíbrio, que funcionou como um foco de contaminação visualizado pela formação de biofilme na microscopia eletrônica de varredura (Figura 19).

Evidenciou-se a presença de diversos pulsotipos distintos, sendo que em uma mesma colheita foi possível observar a presença destes pulsotipos no ambiente de ordenha e no leite das vacas com mastite, chamando a atenção para as borrachas dos insufladores, mangueiras, borracha do vácuo e até mesmo a mão dos ordenhadores como pontos de manutenção de micro-organismos e contaminação do leite.

Considerando que no rebanho a rotatividade dos animais na sala de ordenha vinham da própria fazenda (rebanho fechado) e raramente animais eram comprados e inseridos na linha de ordenha, considera-se que a diversidade destes pulsotipos constituíam um próprio ambiente na propriedade estudada.

Quando as estirpes de *S. aureus* foram avaliadas de acordo com a data de obtenção verificou-se que nenhum pulsotipo foi encontrado mais do que em duas colheitas consecutivas e que houve uma ampla distribuição dos pulsotipos ao longo dos meses, sendo que muitos deles apareceram uma única vez em um determinado mês, enquanto que outros persistiram e apareceram depois de muitos meses como exemplo os pulsotipos 1, 2 e 20 com estirpes isoladas em outubro, novembro e depois reisoladas em junho e julho sendo que estas estirpes que foram persistentes, foram oriundas de amostras de leite de vacas e uma do leite do tanque expansão fato este que resulta das diferenças encontradas dos pulsotipos isolados de leite e de ambiente de ordenha (Tabelas 7a e 7b).

Os meses que apresentaram maior número de pulsotipos foram janeiro, novembro e abril. Observa-se também que nos meses de dezembro, janeiro e abril foram os meses com maior quantidade de locais diferentes com disseminação dos pulsotipos, sendo também estes meses de maior intensidade pluviométrica mensal, principalmente, dezembro e janeiro (ANA, 2011). Com o aumento da umidade, à

adesão microbiana a superfície é favorecida em conjunto com a matéria orgânica e o ambiente sujo, associado a falhas no processo de higienização, sendo então, favorecido a disseminação destes clones em vários pontos no ambiente de ordenha (Tabelas 7a e 7b).

Tabela 6a. Distribuição de 39 pulsotipos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite bovina, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008 /2009.

Pulsotipos	Origem	Estirpes Isoladas	
		n	%
2	Leite vacas (2)	2	0,88
5	Leite vacas (5)	5	2,21
6	Leite vacas (2)	2	0,88
7	Leite vacas (1)	1	0,44
8	Leite vacas (7)	7	3,10
9	Leite vacas (1)	1	0,44
10	Leite vacas (3)	3	1,33
12	Leite vacas (4)	4	1,77
15	Leite vacas (3)	3	1,33
16	Leite vacas (4)	4	1,77
17	Leite vacas (2)	2	0,88
19	Leite vacas (3)	3	1,33
24	Leite vacas (2)	2	0,88
25	Leite vacas (1)	1	0,44
26	Leite vacas (1)	1	0,44
27	Leite vacas (2)	2	0,88
28	Leite vacas (1)	1	0,44
29	Leite vacas (2)	2	0,88
31	Leite vacas (1)	1	0,44
32	Leite vacas (3)	3	1,33
33	Leite vacas (8)	8	3,54
34	Leite vacas (2)	2	0,88
35	Leite vacas (11)	11	4,87
36	Leite vacas (2)	2	0,88
37	Leite vacas (1)	1	0,44
38	Leite vacas (1)	1	0,44
42	Leite vacas (3)	3	1,33
45	Leite vacas (3)	3	1,33
46	Leite vacas (4)	4	1,77
47	Leite vacas (5)	5	2,21
48	Leite vacas (2)	2	0,88
52	Leite vacas (1)	1	0,44
53	Leite vacas (6)	6	2,65
54	Leite vacas (2)	2	0,88
58	Leite vacas (3)	3	1,33
59	Leite vacas (4)	4	1,77
60	Leite vacas (8)	8	3,54
64	Leite vacas (2)	2	0,88
69	Leite vacas (4)	4	1,77
Total		122	54,00

Tabela 6b. Distribuição de 31 pulsotipos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite bovina, leite do tanque de expansão e ambiente de ordenha em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/ 2009.

Pulsotipos	Origem	Estirpes Isoladas	
		N	%
1	Leite vacas (2), Insufladores (1)	3	1,33
3	Insufladores (2), Mangueiras (2), Mão-de-ordenhador (1)	5	2,21
4	Insufladores (1)	1	0,44
11	Leite vacas (1), Insufladores (1)	2	0,88
13	Insufladores (1)	1	0,44
14	Leite vacas (1), Insufladores (2)	3	1,33
18	Insufladores (1) Mangueiras (1)	2	0,88
20	Leite tanque expansão (1), Leite (1)	2	0,88
21	Superfície tanque expansão (1), Insufladores (3), Mangueiras (1)	5	2,21
22	Leite tanque expansão (1), Leite (1)	2	0,88
23	Leite vacas (2), Insufladores (1)	3	1,33
30	Insufladores (4)	4	1,33
39	Leite vacas (2), Leite tanque expansão (1)	3	1,33
40	Leite vacas (1), Saída do tanque equilíbrio (1)	2	0,88
41	Insufladores (1)	1	0,44
43	Insufladores (1)	1	0,44
44	Insufladores (1), Mãos-de-ordenhadores (1), Saída do tanque equilíbrio (1), Borracha do vácuo (1)	4	1,77
49	Leite vacas (1), Mãos-de-ordenhadores (2), Insufladores (1)	4	1,77
50	Leite (5), Mangueiras (1), <i>S. aureus</i> (1)	7	3,10
51	Leite (1), Saída tanque equilíbrio (1), Insufladores (1)	3	1,33
55	Leite vacas (3), Insufladores (1)	4	1,77
56	Leite vacas (6), Insufladores (1)	7	3,10
57	Insufladores (2)	2	0,88
61	Insufladores (7), Mangueira (1)	7	3,10
62	Mãos-de-ordenhadores (4), Superfície do tanque de expansão (1)	5	2,21
63	Leite vacas (1), Mangueiras (1), Insufladores (2)	4	1,77
65	Borracha da tampa do tanque equilíbrio (1), Superfície do tanque expansão (1)	2	0,88
66	Insufladores (3), Leite tanque expansão (1)	4	1,77
67	Borracha vácuo (1), Insufladores (2)	3	1,33
68	Leite vacas (1), Insufladores (5)	6	2,65
70	Insufladores (2)	2	0,88
Total		104	46,00

Tabela 7b: Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com as datas de obtenção, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008 /2009.

Pulsotipos	Data de obtenção														SE	TOTAL
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A			
36	2L V														2	0,88
37												1LV			1	0,44
38			1LV												1	0,44
39		2LV, 1LT E													3	1,33
40		1L V	1ST E												2	0,88
41							1L V								1	0,44
42							1L V	2L V							3	1,33
43													1I S		1	0,44
44									1IS,1ST E, 1BV,1M O						4	1,77
45							3LV								3	1,33
46							4L V								4	1,77
47		3L V	2LV												5	2,21
48												2LV			2	0,88
49									2MO, 1IS,1L						4	1,77
50			3LV								1LV	1M,1LV			6	2,65
51												1LV	1IS, 1ST E		3	1,33
52				1LV											1	0,44
53				6LV											6	2,65
54						2LV									2	0,88
55						2LV					1LV		1I S		4	1,77
56				3LV		4LV									7	3,10
57					2IS										2	0,88
58				3LV											3	1,33
59						2LV						2LV			4	1,77
60				2LV		1LV			5LV						8	3,54
61			6IS,1 M												7	3,10
62						1STE , 4MO									5	2,21
63					1LV	2IS,1 M									4	1,77
64									1LV			1LV			2	0,88
65			1ST E,1B TE												2	0,88
66					1LTE	3IS									4	1,77
67						2IS, 1BV 5IS									3	1,33
68									1LV						6	2,65
69									4LV						4	1,77
70						2IS									2	0,88
TOTAL	17	22	18	26	25	32	9	19	26	0	6	21	4	0	22	100

A associação entre os isolados de *S. aureus* provenientes de mastites e os locais de isolamento são de extrema importância epidemiológica. As linhas de ordenha são locais de intenso manejo, que podem propiciar condições de veiculação de patógenos para a glândula mamária, especialmente *S. aureus*, caso sejam negligenciados os procedimentos de desinfecção dos equipamentos de ordenha e de higiene da glândula mamária durante a pré ordenha (SANTOS et al. 2003).

FERREIRA (2008) obteve 39 pulsotipos, das 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, em trabalho realizado em Nova Odessa-SP. Observou também que houve a manutenção e a disseminação clonal de alguns pulsotipos identificados nas amostras analisadas, além de verificar a ocorrência de estirpes de *S. aureus* com pulsotipos iguais em uma mesma colheita. Nas amostras de leite, óstios papilares e insufladores da ordenhadeira mecânica evidenciou a relação epidemiológica existente entre as fontes de infecção e vias de transmissão.

SOUZA (2010) estudando 103 estirpes de estafilococos no PFGE verificou que os pontos de colheita de amostras que apresentaram maior frequência de isolamento de estirpes de *Staphylococcus aureus* foram os óstios papilares (31,1%), o leite das vacas reagentes ao CMT (21,7%), os insufladores das ordenhadeiras mecânicas (21,7%), o leite dos latões (6,6%) e o leite contido nos tanques de expansão comunitários (5,6%). Foram identificados 32 pulsotipos diferentes e com as seguintes frequências: 10% dos pulsotipos estiveram presentes nos óstios papilares, 5,8% nas amostras de leite e 3,8% nos insufladores.

LANGE et al. (1999) registraram, ao pesquisar 66 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite no sul do Brasil, 33 pulsotipos distintos e, também em 15,1% das amostras, a presença de um mesmo padrão de restrição do DNA.

Tabela 8a: Distribuição de 22 pulsotipos quanto a resistência a quatro antimicrobianos e seis genes relacionados com a produção de biofilmes

Pulsotipo	Estirpe	Origem	Grupos	Resistência e Sensibilidade				Genes / Biofilmes					
				<i>Cli</i>	<i>Pen</i>	<i>Eri</i>	<i>Oxa</i>	<i>hla</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>bap</i>	<i>agrA</i>	<i>icaD</i>
19	468	Leite	A	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
42	262	Leite	A	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
9	274	Leite	B1	S	R	R	R	P	P	P	N	P	P
14	296	Insuflador	B2	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
14	295	Insuflador	B3	S	R	R	S	P	P	P	N	P	P
11	294	Insuflador	B3	S	R	R	S	P	P	P	N	P	P
4	123	Insuflador	C1	S	R	S	S	P	P	P	N	P	P
3	122	Insuflador	C2	S	R	R	S	P	P	P	N	P	P
3	124	Mangueira	C2	R	R	S	R	P	P	P	N	P	P
31	96	Leite	D1	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
23	80	Insuflador	D2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
29	2	Leite	D3	S	R	S	S	P	P	P	N	P	P
29	10	Leite	D3	S	R	S	S	P	P	P	P	N	P
21	87	Mangueira	E	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
21	88	Insuflador	E	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
50	65	Leite	F	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
57	114	Insuflador	F	S	R	R	S	P	P	P	N	P	P
33	21	Leite	G1	R	R	R	S	P	P	P	P	N	P
35	39	Leite	G2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
35	36	Leite	G2	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
35	30	Leite	G2	S	R	R	S	N	P	P	P	P	N
35	35	Leite	G2	S	R	R	S	P	P	P	P	P	N

Tabela 8b : Distribuição de 23 pulsotipos quanto a resistência a quatro antimicrobianos e seis genes relacionados com a produção de biofilmes.

Pulsotipo	Estirpe	Origem	Grupos	Resistência e Sensibilidade					Genes / Biofilmes				
				<i>Cli</i>	<i>Pen</i>	<i>Eri</i>	<i>Oxa</i>	<i>hla</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>bap</i>	<i>agrA</i>	<i>icaD</i>
60	334	Leite	H1	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
63	160	Leite	H2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
60	335	Leite	H3	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
63	177	Insuflador	H4	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
63	179	Mangueira	H4	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
64	336	Leite	I1	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
62	186	Mão de ordenhador	I2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
62	185	Mão de ordenhador	I2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
62	182	Superfície do TE	I2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
68	183	Mão de ordenhador	I2	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
68	169	Insuflador	J	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
68	170	Insuflador	J	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
68	171	Insuflador	K	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
65	54	Borracha do Tequilíbrio	K	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
47	28	Leite	L	R	R	S	S	N	P	P	P	P	P
39	43	Leite	M	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
38	61	Leite	M	S	R	S	S	N	P	P	N	P	P
66	162	Leite TE	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
67	181	Borracha vácuo	N	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
58	58	Leite	O	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
59	188	Leite	O	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P
53	105	Leite	P	R	R	R	S	P	P	P	N	P	P
56	210	Leite	P	R	R	R	R	P	P	P	N	P	P

Entre as 225 estirpes de *S. aureus* tipificadas, 180 (80%) apresentaram os seis principais genes estudados e 45 (20%) apresentaram diferenças genéticas para formação de biofilme quando avaliadas em relação a estes genes e foram agrupadas juntamente com os pulsotipos e a sensibilidade e resistência a quatro antimicrobianos estudados. Foi possível observar que a resistência e sensibilidade das estirpes variou dentro os pulsotipos e até em um mesmo pulsotipo, sendo assim, a resistência aos antimicrobianos foi um fator independente da habilidade inata dos micro-organismos se aderirem ou não às superfícies. Em alguns pulsotipos como exemplos 62, 63 e 68, foi possível observar o mesmo padrão de resistência aos antimicrobianos e também o mesmo perfil da presença dos genes de formação de biofilme, sendo estes pulsotipos de estirpes colonizadoras de superfícies de equipamentos de ordenha (Tabelas 8a e 8b).

Dos genes avaliados da formação de biofilme observou-se que em algumas estirpes isoladas de leite não apresentaram os genes *hla*, *agrA*, *bap* e *icaD*. Nas estirpes avaliadas de ambiente de ordenha, o gene não apresentado com maior frequência foi gene *bap*. O gene *bap* é importante nos processos de patogenicidade de adesão dos micro-organismos na glândula mamária. O gene *bap* não influenciou os processos de adesão das estirpes de ambiente de ordenha, sendo esta adesão as superfícies abióticas mais influenciada por outros genes. Já as estirpes isoladas de leite apresentaram maior frequência de positividade para o gene *bap*, sendo este um gene importante para adesão às células (Tabelas 8a e 8b).

Todos os pulsotipos apresentaram genes *clfA* e *clfB* podendo este ser um dos genes mais importantes no processo de adesão e manutenção dos biofilmes. Os pulsotipos mais frequentes (33, 35 e 60) que são pulsotipos exclusivos de amostras de leite apresentaram variabilidade na frequência dos genes e no perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo estes pulsotipos de uma capacidade de adaptação e mudança superior aos pulsotipos isolados de ambiente de ordenha (Tabelas 6a, 8a e 8b). Estes dados também foram

relatados por outros autores, os quais sugerem que algumas estirpes de *S. aureus* que colonizam regiões extramamárias, não são as mesmas que causam infecção intramamária (ZADOKS et al. 2002).

LARSEN et al. (2008) relatam que em estudo realizado com 625 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite em nove propriedades da Dinamarca, algumas estirpes apresentaram habilidades particulares de colonizar ou de persistir na glândula mamária bovina, inclusive durante o período seco, de modo a acarretar aumento da incidência de casos de mastite no rebanho. Observaram também neste estudo que os pulsotipos persistentes foram re-isolados nos meses de Junho e Julho (período seco), o que explica a importância da utilização da antibioticoterapia neste período como medida de controle da mastite bovina. Este fato destacado pelos referidos autores, talvez possa também ter contribuído para a introdução de novos pulsotipos nas datas supracitadas.

No entanto, não foram encontrados dados na literatura sobre a persistência de estirpes isoladas de ambiente de ordenha, principalmente, insufladores, mangueiras e mãos-de-ordenhadores. Neste trabalho também não foi observado a persistência de estirpes de ambiente de ordenha em novos reisolamentos ao longo dos meses avaliados.

Deve-se assinalar, contudo, que na propriedade objeto desta investigação foi realizada a antibioticoterapia para o tratamento de vaca seca, sendo utilizado para tanto o antibiograma de alguns animais. Nem todos os animais eram submetidos ao tratamento após a realização do antibiograma individual. Em alguns meses também não foi realizado o antibiograma o que pode ter ocorrido seleção de estirpes mais resistentes devido ao uso generalizado dos mesmos antimicrobianos para todos os animais.

FERREIRA et al. (2006) ressaltam, ainda, o risco de falhas no tratamento da mastite, caso sejam extrapoladas para todos os animais do rebanho, as informações obtidas pelo antibiograma de algumas estirpes de *S. aureus* nos animais em uma mesma propriedade.

Nos meses de novembro, dezembro e janeiro foram registrados maior número de pulsotipos isolados, fato este que também pode ser explicado pela introdução de novos animais após o parto na linha de ordenha neste período. Segundo BRAMLEY & DODD (1984), muitos quartos mamários desenvolvem inflamação crônica que frequentemente podem persistir por mais de uma lactação, associados a formação de biofilme na glândula mamária.

Tanto os pulsotipos isolados de ambiente de ordenha quanto os isolados de leite apresentaram um perfil de resistência alto aos antimicrobianos sendo eles, clindamicina, penicilina, eritromicina e oxacilina, sendo que neste último os micro-organismos apresentaram maior sensibilidade entre as 45 estirpes avaliadas. Pesquisas registram que isolados de insufladores foram mais resistentes que isolados de leite . (FOX et al. 2005; FERREIRA et al. 2008). Os quatro antimicrobianos analisados frente as 45 estirpes não apresentaram diferenças significativas de resistência aos antimicrobianos entre isolados de insufladores e isolados de leite (Tabelas 8a e 8b).

A alta variabilidade dos perfis de resistência aos antimicrobianos revelada pelos isolados de *S. aureus* em algumas propriedades leiteiras é preocupante, pois muitos dos antibióticos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre esta bactéria dificultando ou impossibilitando o tratamento dos animais com mastite e trazendo maiores gastos e prejuízos para os proprietários (FREITAS et al. 2005).

FERREIRA et al. (2008), estudou pulsotipos de *S.aureus*, isolados de casos de mastite bovina, insufladores e óstios papilares, associados a resistência aos antimicrobianos sendo que 169 (69,0%) estirpes de *S. aureus* apresentaram resistência a penicilina. Dentre essas, 24 (14%), 49 (29%) e 96 (57%) foram isoladas dos insufladores, dos óstio papilar e do leite, respectivamente. Por outro lado, revela também, que as maiores taxas de resistências ocorreram frente ao Cefepime (19,6%), a Oxacilina (16,3%) e a Clindamicina (14,7%).

Vinte e um (47%) destes 45 isolados foram sensíveis a Oxacilina, sendo que a maioria dos que foram sensíveis foram oriundas de amostras de leite. Já

para a Penicilina e Eritomicina as taxas de resistência foram mais elevadas, sendo a Clindamicina com uma resistência intermediária entre a Oxacilina e a Eritromicina.

Quando estes 45 perfis foram agrupados entre si foi possível dividir-los em 16 grupos maiores (A à P) e 16 subgrupos. Observou-se que em alguns grupos houve similaridade por local de adesão, resistência aos antimicrobianos e presença de genes de formação de biofilme sendo eles os grupos e subgrupos: A, B3, E, I2, J e K (Figura 22).

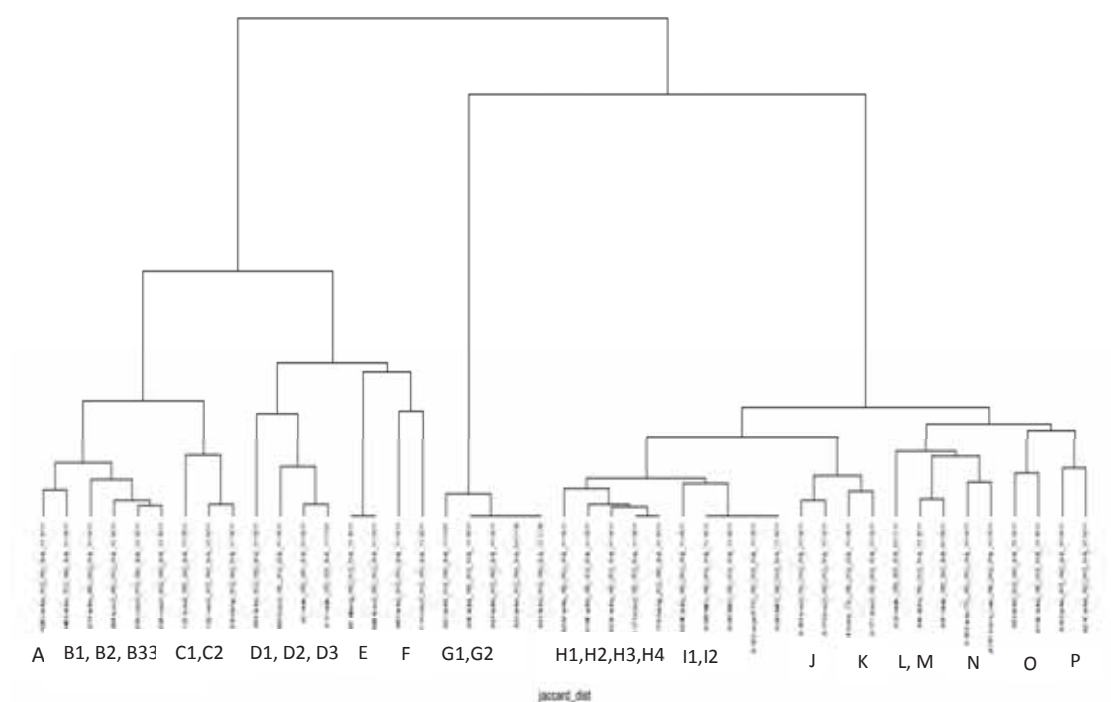


FIGURA 22: Dendrograma de 45 pulsotipos agrupados com seis tipos de genes e quatro tipos de antimicrobianos. Legenda: R1: resistência a Clindamicina, S1: sensibilidade a Clindamicina; R2: resistência a Penicilina; R3: resistência a Eritromicina; S3: Sensível a Eritromicina; R4: resistência a Oxacilina; S4: sensibilidade a Oxacilina; (1): presença, (0): ausência; ordem de numeração para os genes: *hla*, *clfA*, *clfB*, *bap*, *agrA*, *icaD*.

Foi possível observar no subgrupo I2, três isolados de mãos-de-ordenhadores apresentando a mesma característica genética e de resistência aos antimicrobianos juntamente com um isolado da superfície do tanque de

expansão. Nos gupos L e M foi possível observar uma variação genotípica e fenotípica para a resistência aos antimicrobianos, indicando que os isolados de leite parecem apresentar uma maior capacidade de adaptação, troca de genes, mutações e alterações de forma a permitir a constante presença dos biofilmes o que possa ser explicado pela persistência de estirpes de *S.aureus* por longos períodos na glândula mamária, às vezes por mais de uma lactação, bem como a permanência dos isolados registrada nesta pesquisa, pelos reisolamentos após quatro, cinco ou até mais meses em uma mesma propriedade leiteira (Tabelas 7a e 7b).

Quanto à avaliação do perfil de resistência e sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus aureus*, isoladas do leite de vacas reagentes ao CMT, do leite do tanque de expansão e do ambiente de ordenha (insufladores, mangueiras condutoras de leite, borracha da tampa do tanque equilíbrio, saída do tanque de equilíbrio, superfície do tanque de expansão e mãos de ordenhadores) no período de Agosto de 2008 à Setembro de 2009 foram avaliadas 440 estirpes frente a doze antimicrobianos para micro-organismos Gram positivos pelo teste de difusão em disco, sendo que destes as estirpes que apresentaram maior resistência foram frente a Penicilina (90%), Eritromicina (80%), Clindamicina (74%), Oxacilina (57%) e Cefepime (48%) respectivamente (Tabela 9).

Esses resultados registram a importância e cuidado da utilização dos antimicrobianos. O uso constante destes antimicrobianos seleciona micro-organismos potencialmente resistentes, e diminui a possibilidade de escolha de outros antibióticos. NUNES et al. (2007) estudaram o perfil de sensibilidade e resistência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina em Portugal e observaram que houve considerável taxa de resistência destes agentes infecciosos frente a penicilina (71,4%) e ampicilina (71,4%).

FONTANA (2002) avaliou amostras de leite mastítico de 96 vacas leiteiras da região de Jataí-GO e isolou 85 amostras de *Staphylococcus* sp. registrando 100% de resistência aos betalactâmicos penicilina, ampicilina e a oxacilina.

A realização de um antibiograma prévio ao tratamento da mastite é importante uma vez que, o uso indiscriminado de fármacos para essa enfermidade vem aumentando a resistência desses patógenos frente aos antibióticos de uso rotineiro. MARTINS et al. (1998) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso freqüente de antibióticos sem exames prévios e aos mecanismos de transferência de resistência entre os micro-organismos.

Outro fato que deve ser considerado é a resistência adquirida das estirpes em biofilmes podendo ser de 10 até 1000 vezes mais resistentes quando em biofilmes (AMORENA et al. 1999).

Assim sendo foi realizado com todas as estirpes sensíveis ao mesmo tempo frente a seis antimicrobianos no teste de disco, o teste de sensibilidade para bactérias em biofilmes. Verificou-se que de 36 estirpes de *S. aureus* sensíveis ao mesmo tempo no teste de difusão em disco a Eritromicina, Gentamicina, Rifampicina, Kanamicina, Vancomicina e Cloranfenicol (a escolha destes antimicrobianos foi devido a dificuldade de compra dos outros agentes, sendo possível apenas a aquisição destes, uma vez que para realizar esta análise é necessário a aquisição dos antimicrobianos em pó, por isso não foi possível encontrar outros antimicrobianos em pó), sendo assim a contagem padrão em placas para células em biofilmes, após 6 horas de tratamento, com concentrações de antibióticos de 100mg/L e 500mg/L revelou que nas concentrações de 100mg/L o antimicrobiano mais eficiente foi a Gentamicina com contagem média de colônias de 41UFC/mL, seguido da Vancomicina com 425UFC/mL e a Rifampicina com 616UFC/mL (Tabela 11). Houve uma alta redução da contagem das células bacterianas em algumas estirpes e em outras essa redução foi baixa, demonstrado que em biofilmes a estirpes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes que na forma planctônica.

Na concentração de 500mg/L o antimicrobiano mais eficiente foi a Kanamicina com contagem média de 38UFC/mL seguida da Vancomicina, Gentamicina, Eritromicina, Rifampicina e Cloranfenicol (Tabela 12).

Observou-se que, nas concentrações de 500mg/L, houve um aumento da tolerância bacteriana frente aos agentes antimicrobianos, fato este também observado em outras pesquisas e que pode ser explicado pelo fato de altas concentrações não ultrapassarem a matriz de exopolissacarídeos (POZO & PATEL, 2007) principalmente, devido quando em pouco tempo de exposição (6 horas nesta pesquisa) além da possibilidade de ocorrer a ligação de proteínas da superfície da matriz como quelantes a estes agentes antimicrobianos inibindo a sua atuação nos patógenos.

AMORENA et al. (1999) avaliaram 4 estirpes de *S. aureus* em biofilmes (6 e 48 horas) frente a 11 antimicrobianos nas concentrações de 1xMBEC, 4xMBEC, 100mg/L e 500mg/L por um período de 6 e 24 horas. Sendo os antibióticos mais eficientes, a rifampicina, vancomicina, cefuroxime entre outros. A gentamicina e eritromicina não apresentaram efeito significativo nas estirpes. Alguns antibióticos apresentaram baixa eficiência quando nas concentrações de 4MBEC e 100mg/L devido a baixa difusão pela matriz. A vancomicina apresentou bons resultados mas no biofilme de 48 horas sua eficiência diminuiu devido a matriz ser maior.

A grande parte dos 36 (89%) dos isolados analisados foram oriundos de leite de vacas e 3 (8%) dos isolados foram oriundos de insufladores e mangueiras. Os isolados de ambiente 21 e 29 pertencentes aos pulsotipos 3 e 49 respectivamente, apresentaram uma maior resistência frente aos antimicrobianos em reduzir a multiplicação das células quando testados na concentração de 100mg/L. Tanto o pulsotipo 3 quanto o pulsotipo 49 foram isolados uma única vez durante os doze meses avaliados sendo um isolado em dezembro e outro em abril e associados a estirpes isoladas de mãos-de-ordenhadores (Tabelas 7a, 7b). Este fato elucida a importância da higienização das mãos evitando a transmissão dos pulsotipos aos equipamentos de ordenhadeira. Na presente pesquisa foi constatada alta taxa de resistência frente aos antimicrobianos quando em biofilmes (Tabelas 11 e 12) e que se passados aos animais poderão acarretar em uma ineficiência no tratamento das mastites.

Neste estudo estes pulsotipos não foram reisolados em outros meses ao longo do período estudado, e somente o pulsotipo 49 foi isolado também no leite das vacas, além do ambiente de ordenha. Essa transmissibilidade das estirpes entre o ambiente de ordenha e animais acarreta sérios problemas não só aos animais quanto ao produtor e ao consumidor deste produto, principalmente quando estes isolados são produtores de toxinas.

Os resultados da ATP-bioluminescência em (URL) revelou uma alta intensidade de sinal de emissão de luz que está diretamente ligada com a quantidade de ATP (diretamente proporcional). Ao avaliar as contagens de colônias das estirpes em relação a luminescência verifica-se também uma alta emissão de luz em estirpes com baixa contagens de células após tratamentos com diversos antimicrobianos, constatando que ainda não existem padrões para associar diretamente com a contagem bacteriana, principalmente devido ao fato da luminescência emitir luz na presença de células mortas dificultando diferenciar a quantidade de células que foram mortas pelos antimicrobianos (Tabelas 13 e 14).

Observou-se uma maior concordância dos resultados de ATP com as contagens microbianas quando estes micro-organismos foram analisados frente a vancomicina e a gentamicina, na concentração de 100mg/L os quais poucas estirpes demonstraram multiplicação acima do controle que era constituído pelas estirpes em biofilmes sem contato com o antimicrobiano. Para os outros agentes antimicrobianos esta associação positiva não foi observada.

Para a concentração de 500mg/L ocorreu uma concordância para a kanamicina quando associada com as contagens microbianas nesta mesma concentração. Estudos futuros são necessários para estabelecer melhor relação do ATP com contagens microbianas para estirpes em biofilmes, a fim de que se possa utilizar este teste para avaliação de contaminação microbiana.

COSTA et al. (2006) utilizaram a ATP-bioluminescência e a contagem microbiana para avaliar a eficiência de limpeza e sanitização de superfícies de aço que entraram em contato com leite, em uma usina beneficiadora deste

produto. Os resultados registraram não haver associação entre técnicas para a classificação das condições higiênicas das superfícies avaliadas, mostrando uma relação indireta entre URL e CFU.cm-2. O método de ATP bioluminescência mostrou que 100% das superfícies estavam em condições de higiene inadequadas, enquanto que o método de contagem de placa detectou apenas 50%. Variações de alta na URL nas medições foram observados, sugerindo a necessidade de mais do que apenas uma análise de superfície, sendo assim, o ATP-bioluminescência não é uma substituição direta para os testes microbiológicos, mas fornece informação complementar e deve ser usado como parte de uma estratégia integrada.

ZOIE et al. (2011) utilizou a técnica de ATP-bioluminescência e a contagem microbiana para medir a contaminação das superfícies nos hospitais. Utilizaram luminômetros comerciais para detectar o número de *Staphylococcus aureus* associados com superfícies. Os dados mostraram que os métodos de bioluminescência testados não eram robustos o suficiente para gerar dados quantitativos sobre o número de bactérias, especialmente em baixas concentrações.

Na presente pesquisa também não ocorreu uma relação direta entre as duas técnicas para todos os agentes antimicrobianos utilizados e também foi observado altas emissões de URL em estirpes com baixas contagens de colônias (UFC), podendo este teste apresentar resultados falso-positivos.

Tabela 9. Resultados dos antibiogramas, pelo teste de difusão em disco, de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite, do leite do tanque de expansão e do ambiente de ordenha, em propriedade leiteira na região de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Antimicrobianos	Estirpes de <i>S. aureus</i> resistentes		Total
	n	%	
Cli	325	74	440
Eri	352	80	440
Pen	396	90	440
Oxa	251	57	440
Cpm	210	48	440
Rif	181	41	440
Clo	136	30	440
Van	194	44	440
Gen	202	45	440
Cip	204	46,4	440
Sut	112	25,5	440
Tet	195	44,3	440

Antimicrobianos; Cli: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Pen: Penicilina; Oxa: Oxacilina; Cpm: Cefepime; Rif: Rifampicina; Clo: Cloranfenicol; Van: Vancomicina; Gen: Gentamicina; Cip: Ciprofloxacina; Sut: Sulfazotrin; Tet: Tetraciclina. Leite: leite de vacas e do tanque de expansão; Ambiente de ordenha: Insufladores; Mangueiras; Borracha do vácuo; Borracha da tampa do tanque de equilíbrio; Saída do tanque de equilíbrio; Superfície do tanque de expansão; Mãos de ordenhadores.

Tabela 10. Contagem de unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de *Staphylococcus aureus* em biofilmes “*in vitro*” isolados de leite de vacas com mastite subclínica, leite de tanque de expansão e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> (Biofilme de 24 horas)	Origem	Pulsotipo	Unidades Formadoras de Colônias X 10³ (UFC/ml)
1	Leite vacas	28	4760
2	Leite vacas	29	4700
3	Leite vacas	24	6060
4	Leite vacas	23	6800
5	Leite vacas	27	6260
6	Leite vacas	-	6100
7	Leite vacas	25	4160
8	Leite vacas	36	7230
9	Leite vacas	33	10360
10	Leite vacas	33	6460
11	Leite vacas	-	7230
12	Leite vacas	33	7130
13	Leite vacas	40	4630
14	Leite vacas	35	5400
15	Leite vacas	35	5730
16	Leite vacas	-	10730
17	Leite vacas	35	5730
18	Leite vacas	47	11230
19	Leite vacas	38	4360
20	Insuflador	57	3400
21	Mangueira	3	3460
22	Leite vacas	5	9000
23	Leite vacas	-	5030
24	Leite vacas	-	7030
25	Leite vacas	-	6660
26	Leite vacas	66	3800
27	Leite vacas	46	7500
28	Leite vacas	12	7660
29	Insuflador	49	7730
30	Leite vacas	-	4560
31	Leite vacas	-	4430
32	Leite vacas	50	3630
33	Leite vacas	-	5400
34	Leite vacas	48	3900
35	Leite vacas	-	8960
36	Leite TE	-	56000

Tabela 11. Contagem das unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de *Staphylococcus aureus*, sensíveis a seis antimicrobianos no teste de difusão em disco, após produção de biofilmes e serem submetidas a 6 horas de tratamento com 6 antimicrobianos diferentes na concentração de 100mg/L.

Isolados de <i>S. aureus</i>	Contagem de colônias (UFC/ml) após tratamento com antimicrobianos (100mg/L)					
	GEN	VAN	ERI	CLO	RIF	KAN
1	0	966	100	8500	560	500000
2	33	733	966	9900	176	260000
3	33	2966	2300	9800	606	250000
4	33	66	1900	7800	890	460000
5	0	366	966	9400	566	500000
6	400	166	2833	1210	463	630000
7	166	33	266	9200	353	430000
8	233	566	2333	1000	526	810000
9	0	600	900	7700	563	830000
10	33	700	1666	9700	643	880000
11	66	1466	666	8500	360	450000
12	0	500	900	7500	430	630000
13	0	700	266	1500	266	60000
14	0	1466	200	8933	400	430000
15	0	500	3633	7766	123	350000
16	0	400	1100	8166	190	800000
17	66	0	1533	7333	103	740000
18	0	166	1266	9933	216	810000
19	66	166	1866	9066	746	560000
20	0	60	600	9900	90	30000
21	33	76	266	1253	546	70000
22	0	0	500	1200	433	660000
23	0	0	5066	1583	1020	860000
24	0	100	2166	8766	633	860000
25	0	0	6166	7500	770	10000
26	0	0	4400	7633	576	40000
27	0	0	8233	5766	200	70000
28	0	66	1033	900	756	640000
29	0	233	1066	6633	870	630000
30	0	100	666	7433	686	760000
31	0	0	1533	9566	5480	720000
32	0	66	2033	7566	410	680000
33	46	366	1433	1450	320	230000
34	60	1433	1433	8200	680	550000
35	70	233	766	5966	410	520000
36	140	66	1533	5566	140	90000
Média	41	425	1793	6511	616	501143

Tabela 12. Contagem das unidades formadoras de colônias de 36 estirpes de *Staphylococcus aureus*, sensíveis a seis antimicrobianos no teste de difusão em disco, após produção de biofilmes e serem submetidas a 6 horas de tratamento com 6 antimicrobianos diferentes na concentração de 500mg/L.

Isolados de <i>S. aureus</i>	Contagem de colônias (UFC/ml) após tratamento com antimicrobianos (500 mg/L)					
	GEN	VAN	ERI	CLO	RIF	KAN
1	4100	0	4600	4900	3700	19
2	3960	3100	4500	5630	3600	28
3	3560	230	4200	3930	5900	24
4	3600	1760	4230	8400	3300	28
5	3700	200	3400	3100	3300	32
6	6130	430	1530	3630	4200	43
7	4100	130	3760	4430	5200	28
8	4100	0	5000	1360	4700	30
9	2960	1630	4900	450	3700	28
10	460	2700	4330	8060	3600	33
11	5730	1200	4560	5530	5400	11
12	2560	1130	3630	8700	5900	28
13	1330	1300	5430	3200	430	22
14	630	1560	5200	4030	3000	28
15	1500	530	6560	7760	7530	27
16	5760	1900	3300	5500	7800	23
17	2060	1830	1860	3100	5830	38
18	2430	200	5400	4330	6360	29
19	3030	660	3360	380	5430	29
20	4730	2400	2660	3100	5760	40
21	1930	2330	3960	3430	2560	38
22	2560	0	3260	3760	1160	31
23	5330	0	2260	8130	3460	34
24	0	1330	1900	4430	4560	26
25	1100	800	4560	8230	460	41
26	3360	660	2860	7330	330	37
27	1130	1500	2660	4200	5160	44
28	4500	1360	3830	3500	3960	60
29	4730	860	1630	2860	2560	86
30	3900	330	1100	2400	4230	70
31	3330	0	2500	3360	130	64
32	4560	0	3530	9760	100	39
33	3000	2400	2260	5460	4300	62
34	2100	360	2630	5430	7300	69
35	5300	60	2360	3330	5830	67
36	2600	160	2240	3360	7230	25
Média	3218	973	3440	4649	4002	38

Tabela 13 - Medidas de luz (URL) emitidas pelo teste de ATP-bioluminescência antes e após a utilização de seis antimicrobianos na concentração de 100mg/L, em isolados de *Staphylococcus aureus*

Isolados de <i>S. aureus</i>	Medidas de ATP em URL ($\times 10^3$)					
	VAN	ERI	RIF	CLO	GEN	KAN
1	600,14	527,18	698,08	982,21	764,93	22,96
2	523,14	464,38	887,15	1240,45	853,62	26,77
3	547,02	484,57	760,41	1045,25	664,31	34,39
4	546,69	478,68	762,18	1064,71	712,93	24,06
5	513,18	455,11	668,26	912,61	659,05	33,43
6	541,31	474,20	627,88	840,65	633,66	11,62
7	547,80	484,21	620,91	835,70	872,60	15,04
8	480,19	424,92	772,80	1082,94	822,29	20,34
9	478,70	421,42	1124,62	1537,55	526,55	23,22
10	475,18	424,72	828,08	1225,86	706,83	87,60
11	503,26	445,30	746,83	1071,87	715,16	29,62
12	176,77	159,98	814,35	1195,75	1005,23	10,78
13	611,93	540,10	589,76	793,90	844,05	26,17
14	523,20	461,24	1136,77	1653,55	618,82	95,80
15	551,80	489,41	550,46	715,60	574,97	54,30
16	594,23	523,05	578,80	744,44	633,19	16,94
17	549,51	483,94	491,39	633,54	553,03	72,20
18	581,12	512,95	521,14	668,59	657,82	22,50
19	564,27	495,58	423,12	531,08	545,91	38,30
20	546,53	478,46	467,30	622,66	603,46	33,00
21	598,34	515,92	499,36	692,83	385,95	20,50
22	529,09	464,04	510,09	713,41	532,40	17,70
23	582,11	506,33	443,54	610,14	591,52	35,70
24	288,45	251,77	556,89	852,07	757,43	78,60
25	562,73	492,60	810,54	1157,63	728,40	43,77
26	512,73	450,31	946,06	1355,17	629,80	22,62
27	452,86	393,93	631,50	878,76	699,78	45,52
28	504,19	442,76	595,55	833,31	691,58	21,74
29	478,17	415,65	369,75	488,79	632,80	19,74
30	399,18	346,51	165,24	193,52	479,78	14,68
31	379,12	330,70	409,74	559,42	462,38	16,85
32	431,38	380,22	591,05	853,41	534,30	68,80
33	488,20	426,32	543,13	782,30	506,78	29,91
34	327,73	285,30	410,43	593,38	473,25	25,63
35	419,96	369,78	375,26	578,18	532,27	6,26
36	507,89	445,74	164,68	204,23	576,88	1,87
Controle	797,92	677,18	547,53	1024,04	684,94	2,35

Tabela 14 - Medidas de luz (URL) emitidas pelo teste de ATP-bioluminescência antes e após a utilização de seis antimicrobianos na concentração de 500mg/L, em isolados de *Staphylococcus aureus*.

Isolados de <i>S. aureus</i>	Medidas de ATP em URL ($\times 10^3$)					
	GEN	VAN	ERI	CLO	RIF	KAN
1	1995,38	321,55	349,46	590,45	455,56	3,93
2	1219,02	295,33	323,63	567,15	437,84	4,97
3	1386,40	311,12	339,02	596,43	455,64	6,10
4	1342,69	254,69	271,58	611,41	461,65	3,97
5	1804,64	186,47	201,67	549,27	418,21	6,30
6	1994,00	303,28	327,84	548,08	422,65	2,33
7	2000,09	221,14	237,88	594,52	445,23	2,78
8	2000,09	269,37	289,87	618,10	467,37	3,74
9	1706,49	321,16	347,32	572,88	428,62	4,35
10	195,33	297,91	322,02	594,61	444,62	1,66
11	833,96	336,26	366,33	578,79	442,54	5,09
12	2000,09	91,24	94,67	514,25	397,44	2,15
13	1999,40	251,23	269,04	626,30	476,29	4,66
14	203,29	337,81	372,32	555,50	433,77	1,68
15	153,41	323,43	355,28	584,59	451,80	0,92
16	1362,43	318,02	347,45	619,48	482,77	2,55
17	1540,89	286,37	315,52	466,07	363,49	1,22
18	915,34	298,72	325,59	721,02	557,51	0,37
19	1590,18	245,16	268,50	318,47	240,65	0,76
20	1759,22	232,93	253,66	333,43	252,63	0,54
21	2000,09	279,64	302,55	360,25	274,60	0,34
22	2000,09	176,26	189,71	573,36	431,62	0,34
23	2000,09	317,30	347,79	357,17	266,71	0,53
24	2000,09	275,80	300,37	424,55	312,16	1,35
25	1265,98	489,80	537,55	372,11	293,47	7,55
26	1232,38	321,10	351,28	509,56	420,25	4,32
27	1620,01	387,48	429,19	722,29	590,67	8,48
28	1119,13	351,23	386,07	445,81	359,41	3,61
29	794,41	357,29	392,29	576,34	459,05	3,61
30	1460,42	382,79	424,73	636,23	511,46	2,95
31	1618,31	338,89	375,15	333,73	266,21	3,75
32	1217,23	320,78	352,82	518,36	422,22	1,33
33	1546,80	349,14	387,54	694,50	564,07	5,48
34	1364,29	309,89	342,66	683,39	551,12	4,90
35	1974,39	346,02	378,98	288,66	228,67	1,03
36	173,22	365,36	401,80	504,57	411,05	3,40
Controle	251,00	311,43	281,40	121,51	878,49	4,25

Os biofilmes constituem uma barreira física, protegendo as bactérias de detergentes e sanitizantes. A resistência intensificada das células no interior dos biofilmes também é atribuída a fatores como baixa taxa de multiplicação das bactérias e neutralização de sanitizantes pela matriz polimérica, já que a mesma é constituída por matéria orgânica (ROSSI & PORTO 2009).

Em pesquisa realizada por Norwood & Gilmour (2000), biofilmes foram expostos a concentrações crescentes de hipoclorito de sódio (200, 500 e 1000 mg de cloro livre /L por 20 minutos). Uma redução de 2 ciclos logarítmicos nas contagens bacterianas foi atingida somente com exposição a 1000 mg de cloro livre/L. Numa cultura planctônica equivalente, 100% dos micro-organismos foram destruídos quando expostos a 10 mg de cloro livre/L por 30 segundos.

BOLTON et al. (1988) isolaram linhagens endêmicas de *Staphylococcus aureus*, em equipamentos utilizados no processamento de aves, oito vezes mais resistentes ao cloro do que linhagens de *S. aureus* isoladas de pele saudável.

No presente estudo, doze estirpes de *S. aureus* oriundas de leite de vacas, leite do tanque de expansão, insufladores e mangueira foram avaliadas frente ao hipoclorito de sódio (150ppm), em quatro tempos, em adesão estática, e em biofilmes. Os resultados revelaram que na etapa de adesão estática, houve uma redução de todas (100%) das células que estavam aderidas a superfície da placa de poliestireno, assim como em trabalhos citados acima que quando as células estão na forma planctônica se tornam altamente sensíveis a ação dos sanitizantes.

Em pesquisa sobre a atuação do hipoclorito de sódio numa solução de 150ppm, para a desinfecção de teteiras por imersão, observaram que nesta concentração o hipoclorito não foi eficiente para reduzir os micro-organismos presentes nas teteiras, mas quando testado como solução para imersão em tetos foi registrada a eficiência na redução dos micro-organismos presentes (AMARAL et al. 2004).

A eficiência do hipoclorito de sódio na concentração de 150ppm, em células com adesão inicial (adesão estática), foi também observada pela coloração fluorescente de DAPI, sendo possível observar a atuação gradativa do hipoclorito, com redução das células aderidas, nos quatro tempo de contato com o mesmo (Figura 23).

Quando estas mesmas estirpes foram avaliadas em adesão por biofilmes, em conjunto com a utilização do tratamento de hipoclorito de sódio (150ppm) e a sua eficácia sobre a higienização das superfícies colonizadas por biofilmes, verificou-se que no tempo de 5 minutos houve multiplicação bacteriana em Ágar de 4 estirpes (33%), sendo uma estirpe de leite de vaca, uma de leite do tanque de expansão, uma de insuflador e uma da mangueira condutora de leite. Nos outros tempos de contato com hipoclorito não ocorreram multiplicação microbiana. Na concentração de 300ppm de hipoclorito de sódio não houve contagem de colônias em nenhum dos tempos analisados após o contato do mesmo com os *S. aureus* (Tabelas 16 e 17).

O presente estudo concorda com os pesquisadores nos parágrafos citados acima sobre o aumento da resistência das células em biofilme quando em contato com substâncias sanitizantes e desinfetantes.

Ao analisar as estirpes em biofilme, que foram resistentes ao hipoclorito de sódio na concentração de 150ppm e associá-las aos pulsotipos verificou-se que das quatro estirpes resistentes, três foram pertencentes ao mesmo pulsotipo (63), sendo elas oriundas de insuflador, mangueira e leite de vaca e uma foi pertencente a um pulsotipo (66) cuja origem foi do leite do tanque de expansão (Tabela 16).

O pulsotipo 63 apresentou os seguintes registros no período analisado: a estirpe oriunda do leite de vaca foi isolada no mês de dezembro e as estirpes oriundas de Insuflador e Mangueira foram isoladas no mês de Janeiro. A persistência do pulsotipo oriundo do leite e permanecendo no ambiente consolida ainda mais que houve falha no processo de higienização associada a formação de biofilme e a resistência ao hipoclorito de sódio na concentração de 150 ppm observado na tabela 16. Sendo assim, pode-se inferir que ocorreu a formação de biofilme no insuflador e mangueira analisados permitindo que a estirpe se tornasse resistente ao hipoclorito de sódio, uma vez que nesta pesquisa ao testar estas estirpes na forma de adesão estática frente ao hipoclorito nestas mesmas concentrações, todas foram sensíveis.

Observou-se também que no mês seguinte o pulsotipo não foi reisolado e este fato pode estar associado a troca dos insufladores e até mesmo a secagem do animal

que apresentou este pulsotipo no mês de dezembro, retirando assim a possibilidade de manutenção dos mesmos na sala de ordenha.

Quanto a avaliação da produção da matriz de polissacarídeos e células bacterianas pelo método do cristal violeta, observou-se que as estirpes de *S. aureus* testadas frente a concentração de 150ppm de hipoclorito de sódio reduziram a produção da sua matriz em: 41%, 66%, zero e 16% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos respectivamente. Na concentração de 300ppm de hipoclorito de sódio ocorreu uma redução de: 83%, 16%, 75% e 58% nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos respectivamente (Tabelas 18 e 19).

TOTÉ et al. (2010) estudou o efeito de biocidas na matriz de exopolissacarídeo dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dos sanitizantes testados apenas o hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio registraram um efeito inibitório sobre a matriz dos biofilmes.

Na atual pesquisa observou-se também uma redução total da matriz de exopolissacarídeos em concentrações de 150ppm e 20 minutos de contato, porém a medida que este tempo aumentou a eficiência de atuação do hipoclorito diminuiu de 100% para 84%. Em concentrações maiores (300ppm) de cloro observou-se que o melhor tempo de ação do hipoclorito foi de 5 minutos seguido do tempo de 20 minutos de contato, fato este que pode ser explicado pelo stress gerado na matriz após 5 minutos e pela baixa difusibilidade do agente em altas concentrações e associados com períodos muito longos (30 minutos).

MARQUES (2005) estudando a ação do hipoclorito de sódio em estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes em diferentes concentrações, observou que o maior efeito ocorreu em concentrações menores, e que em muitas vezes, em concentrações maiores a matriz de exopolissacarídeos ficou mais espessa.

A comparação dos hipocloritos (hipoclorito alcalino), cloro livre e cloraminas tem sido realizada muitas vezes. Por exemplo, os biofilmes formados por *P. aeruginosae* e *K. pneumoniae* foram expostos aos efeitos desses agentes e da concentração de cloro ativo dentro do biofilme e foi medida em células viáveis usando microeletrodos (STEWART et al. 2001).

Foi observado que as cloraminas penetraram no biofilme 6-8 vezes mais rápido do que o hipoclorito; No entanto, as bactérias que formaram o biofilme foram altamente resistente aos dois agentes. Na pesquisa de Jang e colaboradores, a medição do ClO_2 (dióxido de cloro), em biofilmes utilizando microeletrodos foi estudada, já que este agente é frequentemente utilizado em diferentes ramos das indústrias de leite e processamento de alimentos (JANG et al. 2006). A investigação da penetração do dióxido de cloro no biofilme mostrou que apenas a concentração inicial acima 25 mg ClO_2/L foi eficiente no biofilme considerando uma profundidade de 100 mm. A eficácia da monocloramina foi muito maior quando em comparação com o cloro livre (TÜRETGEN 2004).

Os agentes clorados podem penetrar no biofilme, mas não conseguem inativar todas as bactérias porque os micro-organismos nos biofilmes carregam mecanismos de proteção contra o efeito letal destes agentes biocidas (STEWART et al. 2001). Este fato e os resultados da presente pesquisa enfatizam que o processo correto e consciente de limpeza, higiene, sanitização e educação sanitária dos trabalhadores deve ser contínuo e diário, além da manutenção dos equipamentos e da troca periódica das borrachas. Se todas essas medidas foram realizadas, o processo de instalação do biofilme será dificultado e com isso a permanência de bactérias patogênicas com a constante contaminação do leite e a presença de mastite nos animais será reduzida podendo ser até mesmo erradicada.

Tabela 15 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de *Staphylococcus aureus* em adesão estática e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 150ppm em quatro tempos diferentes.

Isolados de <i>S. aureus</i> / número	Origem	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> em	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> pós tratamento com Hipoclorito de Sódio (150ppm)			
		Adesão Estática	5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos
106	Leite vacas	20x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
123	Insufladores	24x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
124	Mangueira	21x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
160	Leite vacas	21x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
162	Leite TE	3x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
164	Insufladores	8x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
166	Insufladores	7x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
167	Insufladores	50x10 ⁴ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
174	Insufladores	31x10 ⁴ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
176	Insufladores	12x10 ⁴ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
179	Mangueira	8x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
205	Leite vacas	3x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO	NO

Legenda: NO: Não foi observada multiplicação bacteriana; TE: tanque de expansão.

Tabela 16– Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de *Staphylococcus aureus* em Biofilmes e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 150ppm em quatro tempos diferentes.

Isolados de <i>S. aureus</i> / número	Pulsotipo	Origem	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> em Biofilmes	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> pós tratamento com Hipoclorito de Sódio (150ppm)			
				5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos
106	52	Leite vacas	31x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
123	4	Insufladores	43 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
124	3	Mangueira	21 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
160	63	Leite vacas	37 x10 ⁵ UFC/mL	20x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO
162	66	Leite TE	42 x10 ⁵ UFC/mL	25x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO
164	66	Insufladores	36 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
166	67	Insufladores	51 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
167	70	Insufladores	59 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
174	67	Insufladores	33 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
176	63	Insufladores	28 x10 ⁵ UFC/mL	15x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO
179	63	Mangueira	32 x10 ⁵ UFC/mL	21x10 ³ UFC/mL	NO	NO	NO
205	56	Leite vacas	30 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO

Legenda: NO: Não foi observada multiplicação bacteriana; TE: tanque de expansão.

Tabela 17 – Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estirpes de *Staphylococcus aureus* em Biofilmes e testadas frente ao Hipoclorito de Sódio na concentração de 300ppm em quatro tempos diferentes.

Isolados de <i>S. aureus</i> / número	Origem	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> em Biofilmes	Contagem média de UFC de <i>S. aureus</i> pós tratamento com Hipoclorito de Sódio (300ppm)			
			5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos
106	Leite vacas	55 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
123	Insufladores	58 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
124	Mangueira	38 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
160	Leite vacas	71 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
162	Leite TE	71 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
164	Insufladores	46 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
166	Insufladores	39 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
167	Insufladores	58 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
174	Insufladores	48 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
176	Insufladores	55 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
179	Mangueira	59 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO
205	Leite vacas	53 x10 ⁵ UFC/mL	NO	NO	NO	NO

Legenda: NO: Não foi observada multiplicação bacteriana; TE: tanque de expansão.

Tabela 18 – Produção de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite subclínica bovina e ambiente de ordenha, antes e após exposição ao Hipoclorito de Sódio (150ppm), em quatro tempos diferentes.

Isolados de <i>S. aureus</i> / número	Origem	Produção de Biofilme de <i>S. aureus</i> quantificado pelo cristal violeta (OD-570nm)	Produção de biofilme de <i>S. aureus</i> pós tratamento com Hipoclorito de Sódio (150ppm) quantificado pelo cristal violeta			
			5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos
106	Leite vacas	0,35	0,51	0,07	0,76	1,060
123	Insufladores	0,79	0,48	0,05	0,98	1,040
124	Mangueira	0,70	0,61	0,05	1,00	0,970
160	Leite vacas	0,79	0,77	0,06	1,00	1,070
162	Leite TE	0,42	0,42	0,04	1,00	1,210
164	Insufladores	0,55	0,66	0,23	1,00	1,500
166	Insufladores	0,59	0,67	0,06	0,92	1,650
167	Insufladores	0,60	0,69	0,08	1,10	1,830
174	Insufladores	0,59	0,70	0,71	0,92	1,500
176	Insufladores	0,64	0,63	0,76	1,10	1,410
179	Mangueira	0,67	0,65	1,30	0,91	0,640
205	Leite vacas	0,87	0,92	1,10	1,07	0,730

Legenda: TE: tanque de expansão

Tabela 19– Produção de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite subclínica bovina e ambiente de ordenha, antes e após exposição ao Hipoclorito de Sódio (300ppm), em quatro tempos diferentes.

Isolados de <i>S. aureus</i> / Número	Origem	Produção de Biofilme de <i>S. aureus</i> quantificado pelo cristal violeta	Produção de biofilme de <i>S. aureus</i> pós tratamento com Hipoclorito de Sódio (300ppm) quantificado pelo cristal violeta			
			5 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos
106	Leite vacas	0,57	0,13	0,56	0,28	0,19
123	Insufladores	0,55	0,29	1,00	0,38	0,62
124	Mangueira	0,42	0,20	0,56	0,25	0,26
160	Leite vacas	0,64	0,46	1,40	0,54	0,32
162	Leite TE	0,37	0,27	1,31	0,26	0,98
164	Insufladores	0,41	0,33	1,63	0,44	1,75
166	Insufladores	0,26	0,21	1,27	0,34	1,54
167	Insufladores	0,67	0,60	0,88	0,30	1,06
174	Insufladores	0,37	0,39	0,48	0,16	0,07
176	Insufladores	0,71	0,65	0,66	0,41	0,11
179	Mangueira	0,13	0,39	0,45	0,30	0,08
205	Leite vacas	0,74	0,61	0,98	0,36	0,07

Legenda: TE: tanque de expansão

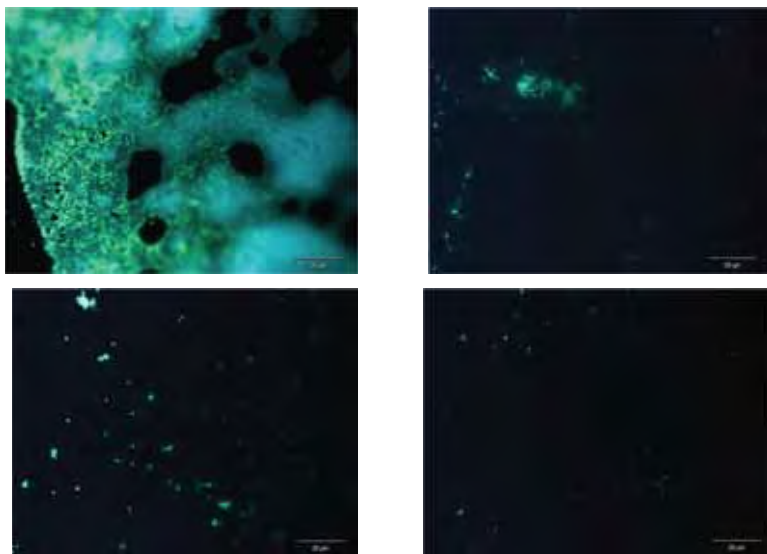


Figura 23. Imagens geradas por microscopia de fluorescência demonstrando a redução de células de *S. aureus* aderidas por duas horas a cupons de poliestireno após o uso do hipoclorito de sódio a 150ppm nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos. Acima da esquerda para a direita *S. aureus* aderidos a cupons de poliestireno e cupons após 5, 10, 20 e 30 minutos de tratamento

Os fagos, de acordo com o seu ciclo de vida, podem convencionalmente ser divididos em dois tipos, os fagos virulentos (líticos) que seguem exclusivamente a via lítica e os fagos temperados que podem seguir adicionalmente o ciclo lisogênico (FERNANDES, 2009).

No ciclo lítico, os fagos utilizam de imediato a maquinaria celular para a replicação do genoma fágico e síntese das proteínas funcionais e estruturais do fago (KUTTER et al. 2005; LENSKI, 1988). Segue-se a montagem dos componentes estruturais, morfogênese dos viriões e lise do hospedeiro, com consequente liberação da progenia viral. Contrariamente, os fagos temperados podem multiplicar-se usando adicionalmente o ciclo lisogênico, no qual o genoma fágico é integrado no cromossoma do hospedeiro, pouco tempo depois da sua entrada na célula bacteriana. Quando isto ocorre o fago passa a ser denominado de pró-fago, ou seja, replica-se juntamente com o cromossomo da célula hospedeira e é transmitido às células filhas, permanecendo num estado quiescente.

As estirpes bacterianas transportando o pró-fago são designadas de lisogênicas e, quando sujeitas a determinados estímulos, há ativação do pró-fago seguida da multiplicação fágica, tal como nos fagos virulentos, culminando na libertação da progenia viral que ocorre após a lise do hospedeiro.

A crescente busca por novas alternativas de tratamento da mastite bovina, o aumento da resistência bacteriana frente aos antimicrobianos, traz os fagos como ótimos candidatos para terapia. Um dos fatores é o fato de não deixar resíduos nos alimentos, e não ser tóxico para o animal. Outro produto dos bacteriófagos que também está sendo estudado é a utilização de suas proteínas líticas, as lisinas, para os tratamentos das infecções bacterianas.

Sendo assim na presente pesquisa a busca por fagos líticos e pró-fagos para doze isolados de *S. aureus* oriundos de casos de mastite bovina e ambiente de ordenha foi realizada. O isolamento de pró-fagos ocorreu em seis de doze estirpes (50%) de *S. aureus* sendo três (50%) de insufladores, duas (33,33%) de leite e uma (16,67%) de mangueira condutora de leite (Tabela 19).

A bactéria indicadora de pró-fagos foi propagada sendo possível observar a lise de cinco isolados diferentes. O isolamento de fagos com possível espectro lítico ocorreu em 4 de 12 estirpes (33%) das estirpes, sendo propagada a sua atuação nas referidas estirpes. A sua atuação frente aos outros isolados não foi testada (Tabela 19).

Estirpes de fago tipo 88, lisogênica para o fago 188, resistentes a antibióticos para *S.aureus* se multiplicaram em uma cultura mista com uma estirpe não lisogênica resistente a novobiocina e adquiriram altas taxas de resistência da estirpe não lisogênica. A lisogenia de estirpes sensíveis ao fago conferiram as células lisadas a habilidade de adquirir marcadores de resistência cromossômica e plasmidial. Algumas proteínas tais como a pronase aumentaram essa taxa de aquisição da resistência (SCHAEFLER, 1982).

Este estudo enfatiza a importância do pró-fagos na transmissão de genes de resistência aos antimicrobianos. Assim é importante, isolar e caracterizar os pró-fagos para uma melhor compreensão dos micro-organismos estudados. Na presente pesquisa, das doze estirpes estudadas, as que apresentaram pró-fagos foram a

estirpes 106, 124, 160, 164, 166, 176. Os pulsotipos associados a estas estirpes foram o 3, 52, 63, 66 e 67 sendo assim verificou-se que estes pulsotipos foram associados tanto ao ambiente de ordenha quanto ao leite de vacas. Destas seis estirpes contendo os pró-fagos quatro (67%) foram resistentes a Clindamicina, Penicilina, Eritromicina e Oxacilina, que foram os quatro antimicrobianos com maior frequência de resistência pelos micro-organismos e uma das estirpes foi sensível a eritromicina e resistente aos outros três antimicrobianos analisados e a outra estirpe foi sensível a clindamicina e resistente aos outros três antimicrobianos já citados acima (Tabela 20).

Entre os pró-fagos isolados verificou-se que estes foram capazes de lisar outras estirpes diferentes de *S.aureus*, e a estirpe mais sensível aos pró-fagos foi o isolado 166, oriundo de insuflador, o qual foi lisado pelas estirpes: 124 e 160. Estes resultados enfatizam a importância que muitos fagos têm para serem utilizados nas terapias sendo capazes de lisar outras estirpes e funcionando como candidatos a produção de substâncias líticas e outros estudos no controle das infecções.

Para compensar as deficiências da quimioterapia, sistemas de fago terapia têm sido desenvolvidos para muitas infecções bacterianas (MERRIL et al. 2003). Têm sido também isolados e caracterizados muitos fagos virulentos contra *Enterococcus faecalis* (UCHIYAMA et al. 2008), *Escherichia coli* (NISHIKAWA et al. 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (WATANABE et al. 2007), e *Serratia marcescens* (MATSUSHITA et al. 2009) de meio-ambiente e na maioria dos casos têm-se mostrado a eficácia da terapia fágica usando modelos animais. Em geral, uma fago virulento, ou seja, que não tem ciclo lisogênico é mais adequado como um fago para a terapêutica do que fagos temperados (que têm um ciclo lisogênico) por causa da falta de fatores relacionados a lisogenia (por exemplo, a insensibilidade do lisogênico ao fago de origem ou fagos relacionados e a inesperada aquisição de patogenicidade e resistência às drogas por genes do genoma hospedeiro) (HOSHIBA et al. 2010).

Por outro lado, fagos de *S. aureus* foram pouco isolados do meio-ambiente, o que pode indicar que fagos de *S. aureus* de vida livre e virulentos são mais raramente presentes no ambiente do que fagos que infectam outras espécies bacterianas, embora alguns destes fagos virulentos foram encontrados em estirpes de *S. aureus* (KWAN et

al. 2005). Portanto, no caso de terapia fágica contra as infecções por *S. aureus*, os fagos temperados também precisam ser considerados, além dos fagos virulentos, como candidatos terapêuticos.

A identificação do fago de *S. aureus* (MR11), foi induzida a partir de um fago lisogênico de *S. aureus* e foi registrada a eficácia da administração deste fago contra a infecção por *S. aureus* utilizando um modelo de infecção em camundongo (MATSUZAKI et al. 2003). O MR11 formador de placas claras mostrou forte atividade lítica em estirpes de estafilococos sensíveis apesar de ser um fago temperado.

Enfatiza-se a importância da continuação e de novos estudos de identificação e caracterização dos fagos e seus produtos para utilização na terapia e controle da mastite bovina.

Tabela 20 – Isolamento de bacteriófagos de estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e ambiente de ordenha, em propriedade leiteira no município de Indianópolis-MG, 2008/2009.

Isolados de <i>S. aureus</i> / Número	Origem	Pulsotipo	Pró-Fagos	Hospedeiro Lisado/ Número Isolado <i>S.</i> <i>aureus</i>	Fagos Isolados (possível espectro “lítico”)
106	Leite vacas	52	Positivo	162	Negativo
123	Insufladores	4	Negativo	-	Positivo
124	Mangueira	3	Positivo	166	Positivo
160	Leite vacas	63	Positivo	166	Positivo
162	Leite TE	66	Negativo	-	Positivo
164	Insufladores	66	Positivo	124	Negativo
166	Insufladores	67	Positivo	166	Negativo
167	Insufladores	70	Negativo	-	Negativo
174	Insufladores	67	Negativo	-	Negativo
176	Insufladores	63	Positivo	167, 160	Negativo
179	Mangueira	63	Negativo	-	Negativo
205	Leite vacas	56	Negativo	-	Negativo

Legenda: TE: tanque de expansão

6. CONCLUSÕES

6.1 Foram isoladas e confirmadas por PCR 440 estirpes de *S. aureus*, sendo 304 de leite de vacas com mastite, 12 do leite do tanque de expansão e 124 de ambiente de ordenha. Das estirpes isoladas de ambiente de ordenha, os locais de maior frequência de isolamento foram os insufladores, as mangueiras e mãos-dos-ordenhadores. Quanto ao período de isolamento, os meses com maior número de isolados foram dezembro, janeiro, março e abril.

6.2 Quanto a habilidade de produção dos biofilmes avaliadas “*in vitro*”, as estirpes oriundas de leite de vacas, do tanque de expansão e do ambiente de ordenha foram 79,4%, 89,5%, 84% e 85% positivas para a produção de biofilmes nos testes do Ágar vermelho congo e microplacas respectivamente.

6.3 Foi possível também visualizar a formação de biofilmes nos cupons de aço e em uma das borrachas utilizadas na sala de ordenha através da microscopia eletrônica de varredura.

6.4 Os genes *hla* e *clfAB* demonstraram maiores frequências de isolamento que os outros genes avaliados, sendo estes genes considerados de grande importância no processo de adesão, formação e manutenção dos biofilmes. O gene *bap* que teve 87% presente nas estirpes de *S.aureus*, demonstrou estar mais presente nas estirpes de leite podendo ser considerado de grande importância na patogenicidade destes isolados.

6.5 O monitoramento das estirpes de *S. aureus* evidenciou a manutenção e a disseminação clonal de alguns pulsotipos identificados nas amostras de leite, nos insufladores da ordenhadeira mecânica e mãos de ordenhadores.

6.6 Houve heterogeneidade genética entre as 225 estirpes de *Staphylococcus aureus* tipificadas, uma vez que foram identificados 70 pulsotipos diferentes.

6.7 Houve a predominância de três pulsotipos, sendo que nenhum pulsotipo foi isolado por mais de duas colheitas sucessivas, e muitos pulsotipos principalmente os isolados de ambiente de ordenha apareceram uma única vez.

6.8 Os pulsotipos isolados de leite de vacas apresentaram uma maior persistência e reisolamentos ao longo do período avaliado. E os meses que apresentaram maior frequência e diversidade dos pulsotipos isolados foram novembro, dezembro, janeiro e abril.

6.9 Quanto a resistência das estirpes de *S. aureus* medidas pelo teste de disco foi associada aos pulsotipos verificou-se que não houve diferença de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos entre os isolados de ambiente e de leite e que o fato das estirpes serem ou não resistentes aos antimicrobianos não influenciou na adesão e produção de biofilmes.

6.10 Os pulsotipos foram também associados com os seguintes genes de formação de biofilme, *hla*, *clfAB*, *agrA*, *bap* e *icaD*, juntamente com quatro antimicrobianos de maior resistência no teste de disco. Esta associação permitiu a classificação de 45 perfis clonais sendo 16 grupos e 16 subgrupos. Foi observado que em alguns grupos ocorreu similaridade por local de adesão, presença de genes formadores de biofilmes e resistência aos antimicrobianos.

6.11 O perfil de susceptibilidade dos *S. aureus* frente aos antimicrobianos no teste de difusão em disco registrou que os micro-organismos mais resistentes foram frente a Penicilina, Eritromicina, Oxacilina e Clindamicina e o antimicrobiano que as estirpes foram mais sensíveis foi o Sulfazotrim.

6.12 Na avaliação de resistência dos estafilococos aos antimicrobianos em biofilmes verificou-se uma maior taxa de resistência das estirpes, sendo que em concentração elevada (500mg/L) a resistência aumentou ainda mais demonstrando que houve falhas na penetração dos antimicrobianos pela matriz dos biofilmes. Na concentração de 100mg/L os quimioterápicos mais eficientes foram a Gentamicina e a Vancomicina.

6.13 O hipoclorito de sódio foi eficaz em eliminar as células bacterianas em adesão estática na concentração de 150ppm e em biofilmes na concentração de 300ppm. Na concentração de 150ppm para biofilmes, algumas estirpes se mostraram resistentes. A redução da matriz de exopolissacarídeos foi mais eficiente nos tempos de contato de 5 minutos e 10 minutos para as concentrações de 300ppm e 150ppm respectivamente.

6.14 A microscopia de fluorescência (DAPI) mostrou redução das células bacterianas, em adesão estática, frente ao hipoclorito de sódio nos cupons de poliestireno.

6.15 Foram isolados seis prófagos (50%) de estirpes de *S. aureus* sendo três oriundas de insufladores, uma de mangueira condutora de leite e duas de leite de vacas, que lisaram cinco estirpes diferentes e três iguais. Foram isolados quatro fagos, de quatro estirpes diferentes, com possíveis espectros líticos oriundos de fezes e urina de vacas holandesas provenientes de uma propriedade leiteira em Portugal.

6.16 Os resultados obtidos sugerem maiores cuidados durante a desinfecção dos equipamentos de ordenha, a troca periódica das borrachas e mangueiras, a utilização de um sistema de linha de ordenha separando animais doentes de animais sadios e a imersão completa dos insufladores em balde com solução clorada respeitando tempo e concentração, além de novos estudos permitindo a utilização dos resultados desta pesquisa para um controle eficaz da mastite bovina.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Sabe-se que os biofilmes estão diretamente associados com casos de mastite bovina o que torna possível observar que as estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilme tem maior habilidade de adesão e persistência na glândula mamária do que isolados de ambiente, visualizados pela distribuição e persistência dos pulsotipos ao longo do período analisado, pois quando avaliadas sobre a produção de biofilme “*in vitro*” essas diferenças foram pequenas. Outro fator importante nesta adesão é o gene *bap* registrada nesta pesquisa também com maior importância para as estirpes isoladas de leite quando comparadas com as estirpes isoladas de ambiente. Sendo assim, e considerando a importância que os estafilococos possuem para a mastite bovina clínica e subclínica ressalta-se o cuidado na terapia antimicrobiana, associando o fato de que a presença dos biofilmes, a resistência bacteriana aumentada, a grande variabilidade de pulsotipos com diversos padrões genéticos (ressaltando aqui a importância dos genes de adesão *clfAB* e *hla*) e divergentes padrões de resistência aos antibióticos. Outro fato importante é a resistência das estirpes isoladas de ambiente resistentes aos desinfetantes, sendo nesta pesquisa, registrada frente ao hipoclorito de sódio. Pelo presente estudo recomenda-se a utilização do hipoclorito por cinco minutos de contato em concentração entre 150 e 200ppm de cloro, além da limpeza mecânica e a remoção dos resíduos por ação física, tal como teteiras ligadas de bombas de pressão. Todos esses fatores e características dos estafilococos e dos biofilmes implicam na instalação de medidas de prevenção, higiene e sanitização, além da troca periódica das borrachas, visto que na borracha da tampa do tanque de equilíbrio foi demonstrado a produção de biofilme, diretamente pela microscopia eletrônica de varredura. Evitar a formação dos biofilmes é o melhor caminho quando ainda pesquisas avançam no sentido de tentar erradicar ou eliminar de alguma forma estas comunidades bacterianas. Por outro lado pesquisas com fagos e a possibilidade de utilização destes na terapia são novos rumos que devem ser melhor estudados como futuras alternativas no combate às infecções. Além das inovações tecnológicas no combate à mastite, alternativas simples como a educação sanitária direcionada aos funcionários com a

conscientização dos proprietários sobre medidas simples de higiene devem ser estimuladas, pois sem as mesmas, nenhuma medida inovadora terá sucesso sem a educação sanitária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology.**, v. 82, p.165-175, 2001.

AMARAL, L.A. et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e a saúde da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, 2004.

AKINEDEN, Ö. et al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. **Clin. Diagn. Labor. Immunol**, v. 8, n. 5, p. 959-964, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 1219p.

AMORENA, B. et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 44, p. 43–55, 1999.

ANA. AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Portal do Governo Federal, 2011. Disponível em: www.ana.gov.br. Acesso em: 15/07/2011.

ANDERL, J. N. et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p. 1251-1256, 2003.

ANTUNES, L.C.M. A linguagem das bactérias. **Ciência Hoje**, v. 33, n.193, p. 16-20, 2003.

ANUÁRIO MILKBIZZ. Anuário Milkbuzz 1999/2000. São Paulo: Milkbuzz, 1999. 326p.

AZEREDO, J.; SUTHERLAND, W. The use of the phages for the removal biofilms. **Current Phamarceutical Biotechnology**, v.9, p.261-266, 2008.

BAIRD-PARKER, A. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Microbiology**, v.69, p.1365-2672.1990.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p.384-404, 2003.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardizied single disc method. **American Journal Clinical Pathology**., Hagerstown, v.45, p.493-496, 1966.

BAYER, A. S. et al. Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal proteins. **Infect Immun**. v.65, n.11 p.4652–4660, 1997.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle,M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. INC, New York, p. 463-523, 1989.

BHAKDI S, TRANUM-JENSEN J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Rev.** v.55, n.4, p.733–751,1991.

BIRREN, B.; LAI, E. **Pulsed field electrophoresis: A practical guide**. Academic Press, San Diego, 1993.

BOLTON, K. J. et al. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants. **Letters in Applied Microbiology**, v. 6, p. 31-34, 1988.

BRABES, K. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev Napgama**, v.3, p.4-11, 1999.

BRAMLEY, A. J., DODD, F. H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 51, p. 481-512, 1984.

BRESOLIN, B.M.Z. et al. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil. **Estud. Biolog.**, v.27, n.59, abr./jun. 2005.

BRITO, M. A. V. P. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 18 (1), p. 39-44, jan/mar., 1998.

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

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 44, p.640-646, 2000.

BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substratum. **FEMS Microbiology**., Amsterdam, v. 46, n.2, p.165-173, June, 1987.

CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.10, p.3214-3217, 2003.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.;VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. Artigo de Revisão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

CERI, H. et al. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CHEUNG, A.L. et al. Review of the SarA protein family. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 40, p.355-361, 2008.

CONLEY, J. et al. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4043-4048, 2003.

COSTA, P. D. et al. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345-349, 2006.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CRAMTON, S.E. et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is presente in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.67, p. 5427- 5433, 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology**, v.183, p. 2888-2896, 2001.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm associated protein *Bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.72, p. 2177-2185, 2004.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Microbiol. Immunol**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.

DUDDRIDGE, J. E.; PRITCHARD, A M. Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. **Proceeding of the conference on Microbial Corrosion**, Teddington, p.28-35, 1983.

EIDHIN, D. N. et al. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v.30, p.245-257, 1998.

FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J.M. Mastite bovina: comparação entre os resultados obtidos no “Califórnia Mastitis Test” e o exame bacteriológico. **Ciência Veterinária Jaboticabal**, Jaboticabal, v.4, n.1, p.4-5, 1990.

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

FERNANDES, A. S. C. **Utilização de lisinas de bacteriófagos no controlo de bactérias patogénicas gram-positivas**. Mestrado em Microbiologia Aplicada. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal. 51p.

FERREIRA, A. C. F. **Avaliação de uma metodologia de atpmetria na monitorização da higiene fabril**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 2008. 93p.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, jul-ago, 2006.

FERREIRA, L.M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina**. 2008. 88p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

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

FONTANA, V. L. D. S. **Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genética e de suscetibilidade à drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus*.** Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho, 2002. 61p.

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

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p.872-874, 1989.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arq. Instit. Biológ**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GALLETI, S. R. Introdução a Microscopia Eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, 2003.

GIBSON, H et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.41-48, 1999.

GOMES, F. **Novas estratégias terapêuticas contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*.** Tese de Doutorado. Universidade do Minho, Braga, Portugal.134p, 2010.

GRESHAM, H. D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. **The Journal of Immunology**, v.164, 3713-372, 2000.

GUTIÉRREZ, et al. Isolation and Characterization of Bacteriophages Infection *Staphylococcus epidermidis*. **Current Microbiology**, v.1, p.200-210, 2010.

HARMON, R. J. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990.

HENSEN , S.M. et al. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1966-1975, 2000.

HOIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes Infection.**, v.3, p. 23–35, 2001.

HOLT, et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 5^a edição, Baltimore, 1994.

HOSHIBA, H. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, /MR25, and its therapeutic potential. **Arch Virol**, v.155, p.545–552, 2010.

HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. **Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacterias**. New York: Marcel Decker Inc.,1994. 613p

ICHIKAWA, M., ICHIKAWA, T., MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. **Anim. Sci. Technol**, v. 67, p. 780-786, 1996.

JAIN, A.; ARGAWAI, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p.163-173, 2004.

JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.**, v. 119, p. 435, 1986.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999, p. 264.

KORNBLUM, J. et al. **Molecular Biology of the Staphylococci**. In Novick, R.P. (ed.), VCH Publishers, New York, pp. 373 -402, 1990.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review **International Journal of Food Microbiology**., Amsterdam, v.42, n.1/2,p.9-27, June 1998.

KUTTER, E., RAYA, R., CARLSON, K. **Molecular mechanisms of phage infection**. In Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. 5th ed. CRC Press, 2005.

KWAN, T. et al. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. **Proc Natl Acad USA**, v.102, p.5174–5179, 2005.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.2, p.127- 141, 1999.

LARSEN, A. R. et al. Epidemiology of European Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 80 Type IV Strains Isolated in Denmark from 1993 to 2004. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v. 46, n. 1, Jan. 2008.

LARSON, E.L. et al.. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. **Food Microbiology**, v.20, p.735-739, 2003.

LELIEVELD, H.L.M., MOSTERT, M.A. & HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. (pp.1-13 & 588-618) Cambridge (England): Woodhead publishing limited, 2005.

LENSKI, R.E. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. **Adv. Microb. Ecol**, v.10, p.1–44, 1988.

LEWIS, K. Programmed death in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.503-514, 2000.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 45, p.999-1007, 2001.

LIU, Y.J., VICO, L.D. & LINDH, R. Ab initio investigation on the chemical origin of the firefly bioluminescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 194, 261-267 (2008).

LISING, M et al. **Comparison of Five DNA Extraction Methods for use with the DiversiLab Microbial Typing System**. 10th Annual Meeting & Exhibits. November 10-13, 2004, Century Plaza Hotel & Spa, Los Angeles, CA

MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**, Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

MACK, D. et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3799-3807, 2000.

MARTINS, R. P et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MARTINS, S.C.S. et al. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade aos quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.56, p. 45-48, 1998.

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

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, v.68, p-337-348, 1971.

MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous DNA based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal Epidemiology**, v.17, p.595-604, 1998.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic Typing Systems. **Infec. Control and Hosp. Epidem**, v. 17, n. 9, p. 595-604, 1996.

MATSUSHITA, K. et al. Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water. **FEMS Microbiol Lett**, v.291, p.201–208, 2009.

MATSUZAKI S. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage uMR11. **J. Infect. Dis**, 187:613–624, 2003.

McDONALD, J. et al. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine**, Beltsville, v.88, n.4, p.382-386, 1993.

McDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacilin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United: Establishing a National Database. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.

MCLAUCHLIN, J. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J. Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.

McLAUGHLIN, R. A.; HOOGEWERF, A. J. Interleukin-1b-induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. **Microbial Pathogenesis**, v.41, p.67-79, 2006.

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

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

103p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

MERRIL, C.R.; SCHOLL, D.; ADHYA, L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, p.489–497, 2003.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. 1.773p

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; 7th ed. NCCLS document M2-A7. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa. 2000.

NISHIKAWA, H. T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of Escherichia coli urinary tract infections. **Arch Virol** 153:507–515(2008) (2008) T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of Escherichia coli urinary tract infections. **Arc.Virol**, 153:507–515

NUNES, S.F. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, 2007.

OLIVEIRA, M. et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**, v.3, n. 260, p. 2-8. 2010.

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.66, p.86-92, 2002.

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

PEREIRA, M.S.V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Lett Appl Microbiol**, v.35, p.32-36, 2002.

POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 82, 204-209, 2007.

PIZZOLITTO, E. L. Contribuição ao estudo in vitro da corrosão induzida por micro-organismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. 1997. 118 f. Tese (Doutorado em biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

REIS, G. L. et al. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Editora FEP MVZ. v.48, p.6-13, setembro, 2005.

RICHARD, H. A. et al. BACTERIAL COAGGREGATION: An integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, London, v.11, n.2, p-94-99, 2003.

ROSSI, A.C.R.; PORTO, E. **A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes**. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, março/abril, 2009.

SAID-SALIM, B. et al. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. **J. Bacteriol**, 185:610–619, 2003.

SANTOS, J. M.; MAIA, A. S. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v. 6, suppl. B, p. 550-551, 1997.

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Rev. Napgama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Manejo de ordenha visando o controle de mastite e a melhoria da qualidade do leite. **In: ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DE MASTITE E MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE**. 1ª ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2007. p.78-94.

SANTOS, S.S. **Investigação da presença de formação de biofilmes por S. aureus em micro usina de beneficiamento de leite**. Dissertação Mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 76.p, 2009.

SCHAEFLER, S. Bacteriophage-Mediated Acquisition of Antibiotic Resistance by *Staphylococcus aureus* Type 88. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, n.3, p. 460-467,1982.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, may, 1984.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Research**, v.130, n.5, p.199-204, 1957.

SEO, Y.S et al. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 433-438, 2008.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.52, n.4, p.917-924, May 2004.

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

STEWART, P. S. et al. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.525-532, 2001.

SONG, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v.13, n.274 p.1859–1866,1996.

SOUZA, V. **Epidemiologia molecular dos Staphylococcus aureus isolados em diferentes pontos no fluxograma de produção do leite** Tese Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 79.p, 2010.

TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 251-258, 1998.

TAKEUCHI, S.M. et al. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.267-274, 2001.

TENOVER, F.C. et al. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Washington, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000. 827p.

TOTÉ , K. et al. Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3135–3142, 2010.

UCHIYAMA, J. et al. Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* phage uEF24C as therapeutic candidate. **FEMS Microbiol Letters**, v.278, p.200–206, 2008.

VALLE, J et al. *SarA* and not *sigmaB* is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**, v. 48, p.1075-87, 2003.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.

WATANABE, R. et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.51, p.446–452, 2007.

WOLZ, C. et al. agr-independent regulation of fibronectin binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, 36:230–243, 2000.

WOLZ, C. et al. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. **Infection and Immunity**, v.70, n.6, p.2758-2762, 2002.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science Technology**, v.49, p. 327–336, 2004.

YOK AI QUE, et al. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin protein by expression in *Lactococcus lactis*. **Infection and Immunity**, v.69, p.6296-6302, 2001.

ZADOKS, R. et al . Comparision of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed field gel electrophoresis, and binary typing. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, p. 3894-3902, 2002.

ZOIE, A. AIKEN.; MICHAEL, WILSON.; PRATTEN J. Evaluation of ATP Bioluminescence Assays for Potential Use in a Hospital Setting. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 32, n. 5, p. 507-509, 2011.

ZOLTAI, P. T.; ZOTTOLA, E. A.; McKAY, L. L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk and milk contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, p.204-208, 1981.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M.L., GENDEL, S.M. (Ed) **Food microbial analysis**: new technologies. IFT basic symposium series. New York: Marcell Dekker, Cap. 16, p.315-3346., 1997.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**., Amsterdam, v.23, n.2, p.125-148, Oct.1994.

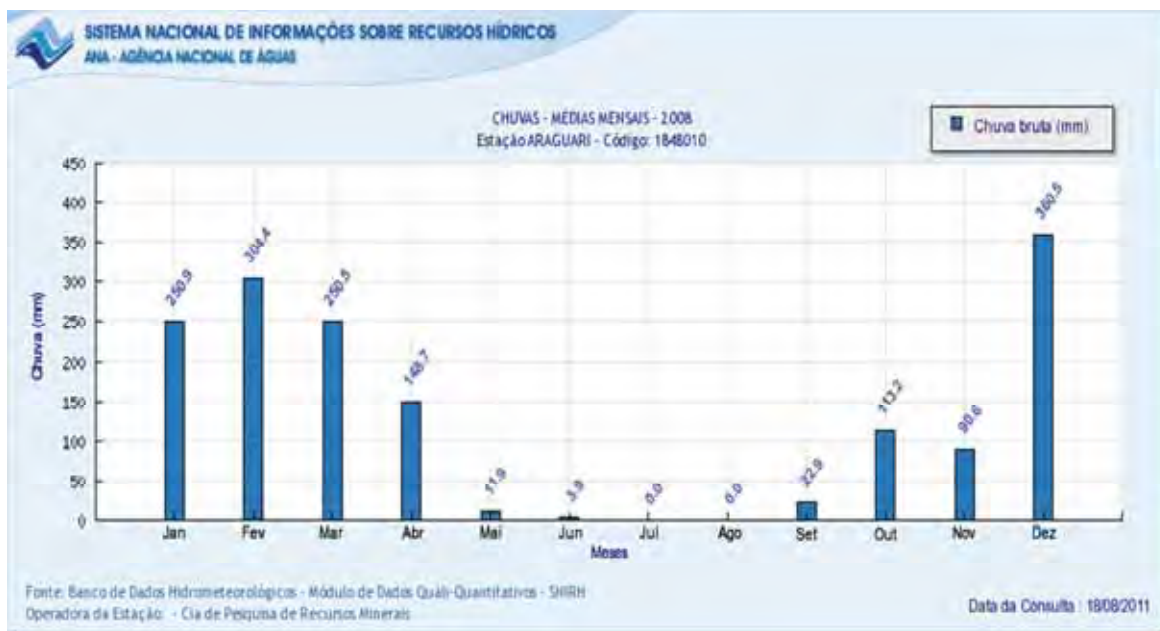
APÊNDICE



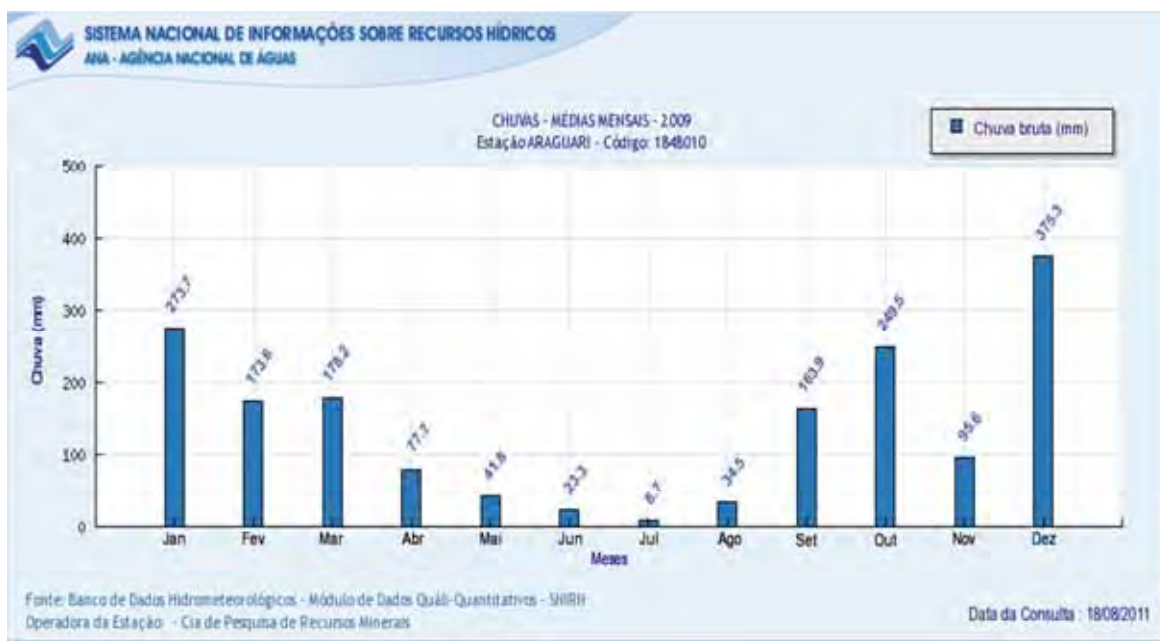
Legenda: Índice pluviométrico na cidade de Uberlândia durante o ano de 2008.



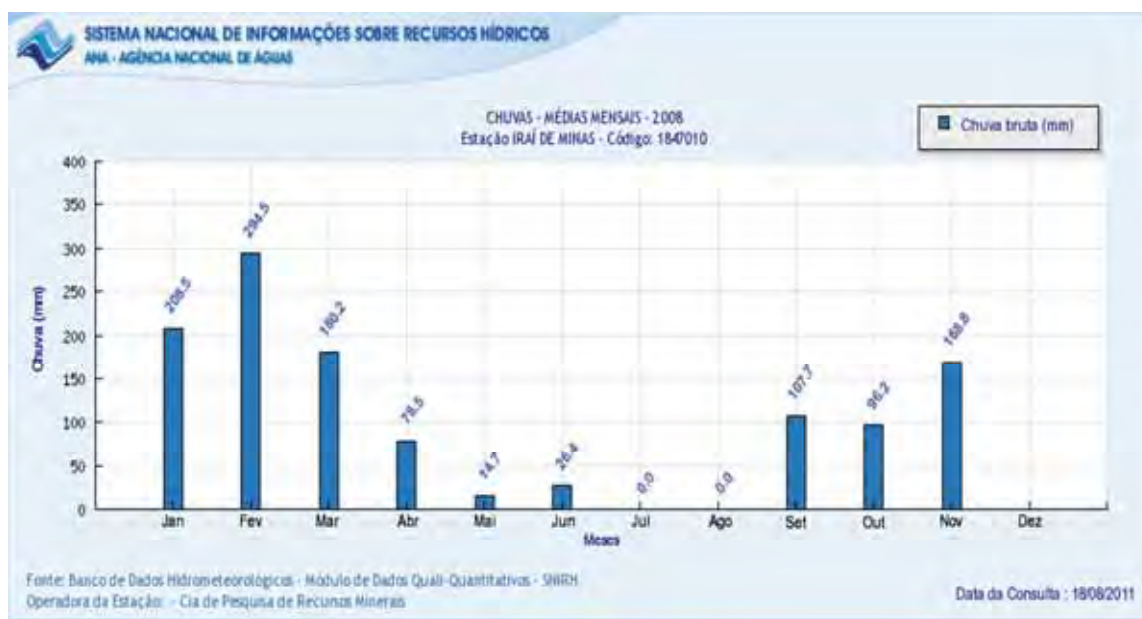
Legenda: Índice pluviométrico da cidade de Uberlândia durante o ano de 2009.



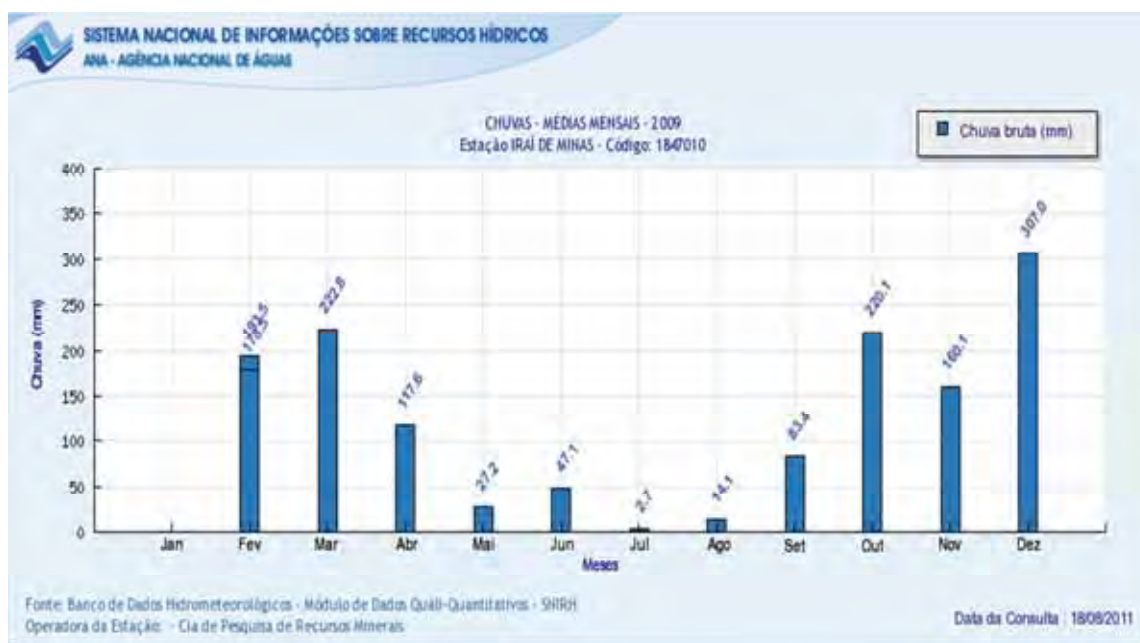
Legenda: Índice pluviométrico da cidade de Araguari durante o ano de 2008.



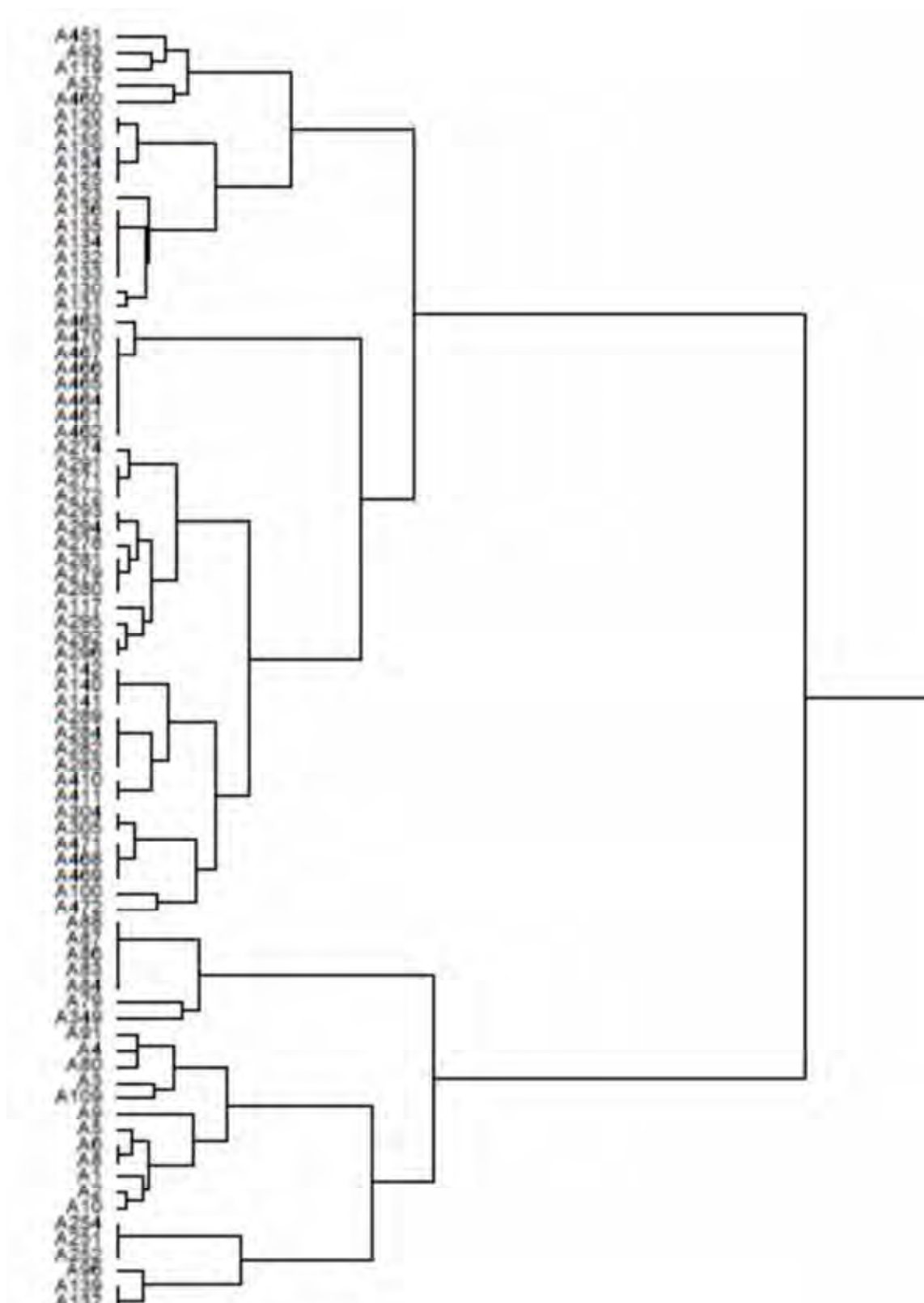
Legenda: Índice pluviométrico da cidade de Araguari durante o ano de 2009.



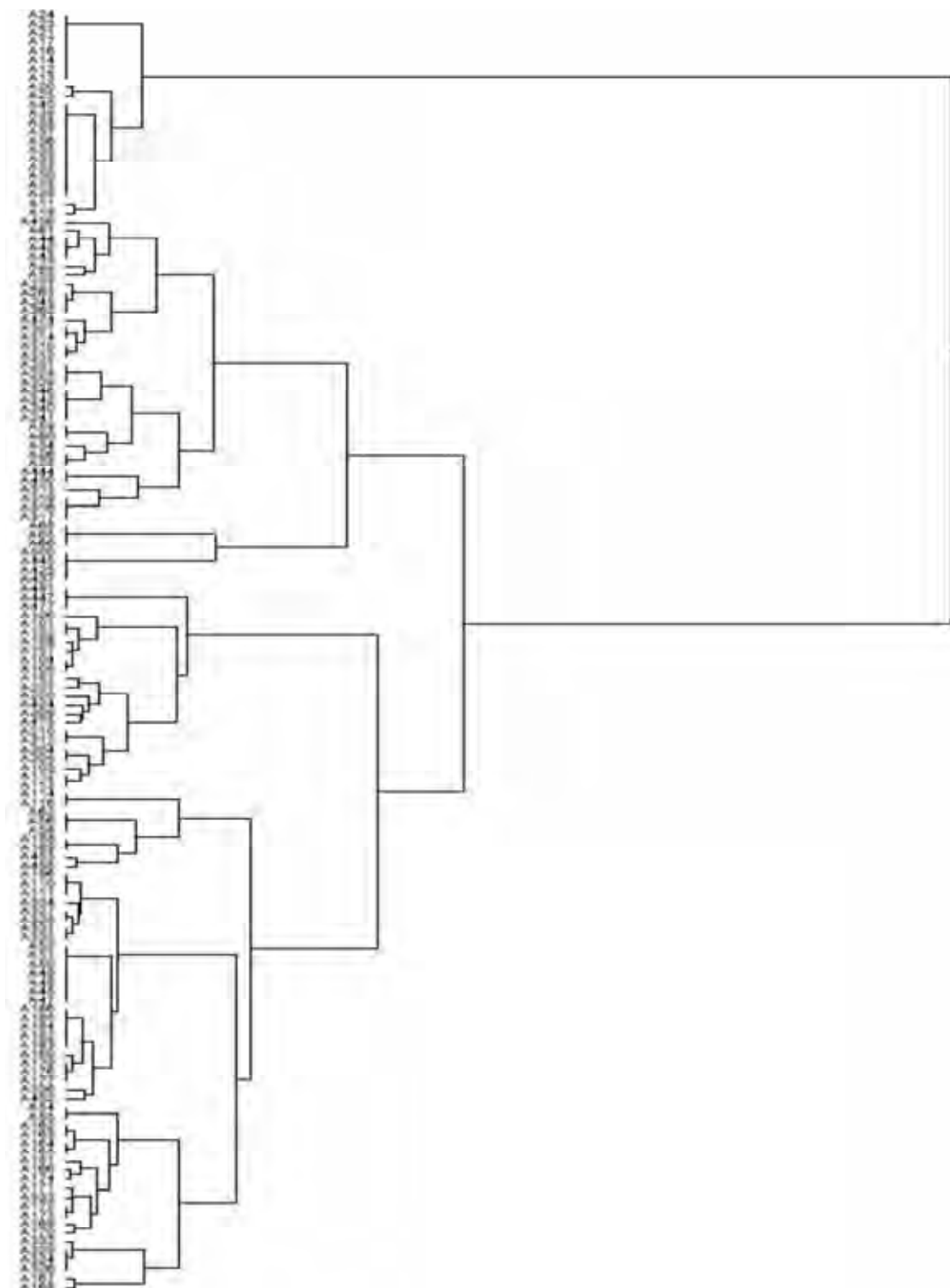
Legenda: Índice pluviométrico da cidade de Iraí de Minas durante o ano de 2008.



Legenda: Índice pluviométrico da cidade de Iraí de Minas durante o ano de 2009.



Legenda: Primeira parte do dendrograma de 225 estirpes de *S. aureus* oriundas de casos de mastite bovina, ambiente de ordenha e leite do tanque de expansão, grupos de 1 a 32 gerados pelo algoritmo WARD e coeficiente de Jaccard.



Legenda: Segunda parte do dendrograma de 225 estirpes de *S. aureus* oriundas de casos de mastite bovina, ambiente de ordenha e leite do tanque de expansão, grupos de 33 a 70 gerados pelo algoritmo WARD e coeficiente de Jaccard.



Legenda: Tanque de expansão, com refrigeração e capacidade para 10.000 litros pertencente a propriedade estudada.



Legenda: Tanque de equilíbrio ou transferidor, demonstrando a tampa com as mangueiras e a borracha do vácuo conectadas.



Legenda: Borracha do vácuo em azul, conectada a tampa do tanque de equilíbrio.