

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DA PRODUÇÃO DE
BIOFILMES POR ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DOS CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA
BOVINA**

POLIANA DE CASTRO MELO

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SP – BRASIL

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DA PRODUÇÃO DE
BIOFILMES POR ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DOS CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA
BOVINA**

POLIANA DE CASTRO MELO

Orientador: Prof. Dr. Antônio Nader Filho

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus
de Jaboticabal–UNESP, como parte das
exigências para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Veterinária - Medicina
Veterinária Preventiva.**

**JABOTICABAL – SP – BRASIL
FEVEREIRO – 2008**

Melo, Poliana de Castro
M528e Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por
 estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite
 subclínica bovina / Poliana de Castro Melo. – – Jaboticabal, 2008
 xvi, 101 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Antônio Nader Filho

Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Elisabeth
Loshchagin Pizzolitto

Bibliografia

1. Biofilmes. 2. Mastite bovina. 3. *Staphylococcus aureus*. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.19-002:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
email: policame@yahoo.com.br

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

**Nunca espere algo que não deseja,
E nunca deseje algo que não espera.
Quando você espera algo que não quer,
Está atraindo o indesejado,
E quando deseja algo que não espera,
Está dissipando a valiosa força mental.
Por outro lado, quando você está na constante,
Expectativa de algo que deseja persistentemente,
Sua habilidade para atrair se torna irresistível.
A mente é um ímã e atrai o que quer que corresponda
Ao seu estado dominante.**

**Dr. Raymond Holliwell, em Working with the Law:
Eleven Truth Principles for Successful Living.**

DEDICO

Aos meus pais Nilza e Luiz, ao meu irmão Rodrigo,
Ao meu avô Geraldo,
Aos meus tios (as) Leninha, Lázaro, Alice e César,
Aos meus primos William, Wellington e Lucas,
As minhas primas Fátia e Bruna,
E as todos meus Familiares,
Pelo apoio, carinho, compreensão,
Força e exemplo de Fé essencial,
Que me ajudaram nesta caminhada
Longe de casa, mas presente nos meus,
Pensamentos.

Ao meu noivo Rafael pelo companheirismo,
Pelo amor, pela espera, pelo apoio e por estar sempre,
Do meu lado.

Aos queridos cães companheiros: Danger, Dolly, Dot e Donna.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela força nos momentos difíceis, pelas alegrias nas conquistas alcançadas, e pela presença constante na minha vida. “Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá. Pois eu sou o Senhor, teu Deus...Dou o Egito por teu resgate, Porque és precioso aos meus olhos, porque eu te aprecio e te amo.” Isaías 43, 2-4.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Antônio Nader Filho**, pela confiança em mim e no meu trabalho, pela amizade, e por sua orientação nestes anos de trabalho.

Aos **Profs. Drs. Luiz Augusto do Amaral e Oswaldo Durival Rossi Junior**, pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos **demais professores** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelo agradável convívio e pelos ensinamentos ministrados.

Á **Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto** (UNESP – Araraquara), por sua indispensável e importante colaboração e sua amizade.

Ao **Dr. Luiz Francisco Zafalon**, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho cedendo, gentilmente, as estirpes de *Staphylococcus aureus* de seu projeto para novos estudos.

Á **todos os funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, em especial **Liliana Biondi Naka (Lila)** e **Waldemar Dibelli Jr. (Diba)**, pela amizade, pelo carinho, pela ajuda e ensinamentos importantes para a realização desta pesquisa.

Á **minha família**, em especial, a **minha mãe**, por me proporcionar esta oportunidade de estar aqui em Jaboticabal e poder cursar a pós-graduação, pelo seu carinho e amor.

Ao **meu padrinho Carlos** e sua esposa Médica Veterinária **Teresa Cristina** pelo apoio e carinho desde minha graduação.

Ao meu noivo **Rafael** pela confiança, companheirismo, pelos dias do meu lado e também nos meus pensamentos enquanto estivemos longe.

Ao **amigo Osvaldo**, pela amizade, consideração e carinho durante estes anos de caminhada.

Ás **minhas amigas (os) de Uberlândia**, em especial as amigas Lívia, Flávia, Bruna, Cláudia, Larissa, Daniela e Ana Luíza que apesar da distância estiveram sempre por perto e no meu coração.

A **Profa. Ms. Sueli** de Uberlândia pela amizade, carinho e apoio.

Aos **Prof. Dra. Denise e Prof. Dr. Paulo** do laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia pela amizade e apoio desde minha graduação.

A **todos os amigos do Cesec Uberlândia**, em especial José Eustáquio, Mara, Jussara, Neir, Eurípia, Orestes, Maria Antônia, Rúbia, Maria Eleusa, Maria Helena, Elza, Cida, Cristina, Maria Joana, Osmar, Eleutério, Maricele, Renízia, Cida, Fátima, Marise, Lúcia e a todos os outros pelo constante apoio, e confiança em mim.

As **amigas de República**, Dáphine, Gerusa, Sabrina, Anita, Maira, Paula, Roberta, Maristela, Pollyanna, pela amizade, e pelas alegrias que passamos juntas.

Aos **amigos de Jaboticabal**, Raphaella, Luciano, Sandrinha, Lívia, Najara, Jú Rossi, Jú Costa, Bruna, Fábio, Susy, Viviane, Tuti (Hinig Isa), Thaís, Natacha, Ana Lígia, Karina, Raquel, Mônica, Tatiane, Raquel, Natália, Claúdia, Aracele, Ana Paula, Ana Claúdia, Jean, Natália (argentina), Michele, Fernanda, Flávia, Gilson, Bruno, Fernanda, Elaine, Lú, Karla, Guido, Luís Guilherme, Leilane, Juliana, Simara, Wanderson e Joice, a todos os amigos do GOU (grupo de oração universitário), a todos os amigos do Grupo Mãe Rainha, aos Padres Paulo e Marcelo da Igreja Santa Tereza e a todos outros que não citei aqui, mas estão guardados no meu coração.

Aos **amigos irmãos Luciano, Vivi e Susy**, pelo companheirismo não só no laboratório, mas pela amizade presente em todos os momentos.

As **amigas** Vandrêa, Graciele e Guta, pela amizade que perdura mesmo com a distância.

A todos os colegas do Departamento de Biologia, Laboratório de Genética de Bactérias, pela ajuda na realização desta pesquisa e também pela amizade.

Ao **CNPq**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida durante o Mestrado.

A **FIOCRUZ**, pelas cepas (ATCC) gentilmente cedidas para a realização deste trabalho.

A **FAPESP**, Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que me ajudaram a vencer mais uma batalha, em especial a aqueles que duvidaram e essa dúvida só fez aumentar a minha persistência e força de vontade.

Muito Obrigado a todos vocês, amigos (as), parentes, professores, colegas, pois vocês contribuíram de alguma forma para a vitória de mais uma luta.

“FELICIDADE: É ter a oportunidade de viver intensamente todos os momentos de uma existência. É olhar para trás e ver que está valendo a pena. É acreditar que tudo que acontece é para o meu bem e para me fazer cada dia mais feliz. A minha felicidade é feita das coisas simples e de pessoas maravilhosas.”

Eduardo Botelho, Minutos de Felicidade.

SUMÁRIO

Assunto	Página
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A Mastite na Bovinocultura Leiteira.....	3
2.1.2 <i>California Mastitis Test</i>	4
2.1.3 Mastite X Tratamento.....	4
2.2 <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3 Biofilmes.....	8
2.3.1 Conceito.....	8
2.3.2 Composição dos Biofilmes.....	8
2.3.3 Teorias da Formação de Biofilmes.....	9
2.4 Aderência Bacteriana.....	10
2.4.1 Fatores que influenciam a adesão bacteriana.....	12
2.4.2 Mecanismo de adesão dos <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5 Constituição da Matriz de Exopolissacarídeos.....	15
2.6 Fase de variação.....	18
2.7 Resistência dos microrganismos nos biofilmes aos componentes do sistema imune.....	18
2.8 Resistência dos microrganismos nos biofilmes aos agentes antimicrobianos.....	19
2.9 Pesquisas de avaliação da produção de biofilmes.....	22

3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção das amostras de leite.....	25
4.1.1 Propriedade A.....	25
4.1.2 Características da propriedade rural e do rebanho.....	25
4.1.3 Propriedade B.....	25
4.1.4 Características da propriedade rural e do rebanho.....	25
4.2 Seleção dos animais.....	26
4.3 Propriedades A e B.....	26
4.3.1 CMT.....	26
4.3.2 Amostras de leite dos quartos mamários para isolamento bacteriológico.....	27
4.3.3 Isolamento e Identificação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.3.4 Teste da Coagulase livre em Tubo.....	28
4.3.5 Teste da Catalase.....	28
4.3.6 Preparação Caldo MRVP.....	29
4.3.6.1 Reativo de Barrit.....	29
4.3.6.2 Teste para Verificar a Produção da Acetoína a partir da glicose (Voges-proskauer).....	29
4.3.7 Teste da utilização aeróbia dos carboidratos (Maltose e Trealose).....	30
4.4 Extração do DNA.....	30
4.5 Amplificação de fragmento de DNA cromossomal para identificação de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.6 Caracterização Fenotípica.....	32
4.6.1 Teste do Agar Vermelho Congo.....	32

4.6.2 Produção de biofilmes “In vitro”.....	33
4.7 Caracterização Genotípica.....	34
4.7.1 Amplificação de DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	34
4.8 Teste de sensibilidade das estirpes de <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos.....	35
4.9 Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1 Produção de “Slime” no Agar Vermelho Congo.....	45
6.2 Quantificação da Produção de Biofilmes pelo Teste de Aderência em Placas.....	46
6.3 Presença dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	47
6.4 Resistência dos <i>S. aureus</i> aos antimicrobianos.....	49
6.5. Avaliação da concordância, sensibilidade, especificidade, e valores preditivos positivos e negativos entre os testes de diagnóstico.....	52
7. CONCLUSÕES.....	56
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8. REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Distribuição das estirpes de <i>S. aureus</i> identificadas por testes bioquímicos, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), em duas propriedades no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.....	37
2. Resultados do estudo fenotípico e genotípico das estirpes de <i>S. aureus</i> para produção de <i>slime</i> , isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.....	38
3. Sensibilidade e resistência das estirpes de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite, de vacas com mastite subclínica, em duas propriedades no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.....	39
4. Distribuição dos resultados das provas fenotípicas e genotípica das estirpes de <i>S. aureus</i> , isoladas de amostras de leite, oriundas de vacas com mastite subclínica, em duas propriedades, no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.....	41
5. Resultados da análise estatística das provas fenotípicas e genotípica das estirpes de <i>S. aureus</i> , para a produção de biofilmes, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, em duas propriedades, no estado de São Paulo, no período de 2001 à 2006.....	43

6. Resultados da análise estatística das provas fenotípicas das estirpes de <i>S. aureus</i> , para a produção de biofilmes, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, em duas propriedades, no período de 2001 à 2006.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavras / Termos	Abreviatura
Agar Vermelho Congo.....	CRA
Brain Heart Infusion.....	BHI
<i>California Mastitis Test</i>	CMT
Colônias produtoras de <i>slime</i>	SP
Colônias não produtoras de <i>slime</i>	NSP
Contagem de Células Somáticas.....	CCS
Especificidade.....	E
Exopolissacarídeo.....	EPS
Kappa.....	K
Significância.....	p
Reação em Cadeia da Polimerase.....	PCR
Sensibilidade.....	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Trypticase Soy Broth.....	TSB
Valor Preditivo Positivo.....	VPP
Valor Preditivo Negativo.....	VPN

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras	Página
Figura 1: Representação esquemática das interações envolvidas na adesão bacteriana a um substrato sólido.....	12
Figura 2: Colônias negras e rugosas no Agar Vermelho Congo, estirpes de <i>S. aureus</i> produtoras de <i>Slime</i>	32
Figura 3: Colônias vermelhas e lisas no Agar Vermelho Congo, estirpes de <i>S. aureus</i> não produtoras de <i>Slime</i>	32
Figura 4: Teste de aderência em microplacas. Poços A1 e A2: ATCC 12228 , <i>S. aureus</i> não produtores de biofilmes. Poços A3 e A4: ATCC 25923 , <i>S. aureus</i> produtores de biofilmes, cepas coradas com Cristal Violeta (1%). Visualização de estirpes positivas (Coloração evidente) e Negativas (Coloração ausente ou Fraca).....	33

ESTUDO FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DA PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DOS CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA.

RESUMO - Estudou-se 94 estirpes de *Staphylococcus aureus* obtidas do leite de vacas com mastite subclínica em duas propriedades rurais no estado de São Paulo. Essas estirpes foram caracterizadas fenotipicamente quanto a produção de biofilmes pelos testes do agar vermelho congo e pelo teste de aderência em microplacas e também foram genotipicamente identificadas pela presença dos genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular. Além disso, todas as estirpes foram também submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Os resultados obtidos revelaram que 85% das estirpes produziram biofilmes “in vitro” para o teste do agar vermelho congo. No teste de aderência em placas foi verificado que 98,9% das estirpes produziram biofilme, devido a forte aderência nas placas de polietileno. A presença dos genes *icaA* e *icaD* foi encontrada em 95,7% das estirpes de *S. aureus*. No antibiograma foi observado que sete estirpes foram resistentes aos seguintes antimicrobianos: cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina e penicilinaG, sendo que as maiores resistências ocorreram frente a gentamicina (2,2%) e a penicilina G (6,6%). Na avaliação dos testes fenotípicos com os genotípicos o teste de aderência em microplacas foi o mais sensível (100%), sendo indicado para identificar estirpes produtoras de biofilmes. Todos os testes, com exceção do antibiograma, foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Palavras-chaves: biofilmes, genes *icaAD*, mastite bovina, *Staphylococcus aureus*.

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC STUDIES OF BIOFILMS PRODUCTION BY
Staphylococcus aureus STRAINS ISOLATED FROM BOVINE SUBCLINICAL
MASTITIS**

ABSTRACT – 94 *Staphylococcus aureus* strains obtained from milk samples of cows suffering from subclinical mastitis in dairy herd, in two properties, in the state of São Paulo were evaluated. These strains were characterized by the *in vitro* slime production on the Congo red agar, biofilm formation and by the presence of *icaA* and *icaD* genes which are responsible for the intercellular adhesion. All strains were too subjected to *in vitro* susceptibility to 12 different antibiotics. The results revealed that 85% of isolates tested produced slime on the Congo red agar and 98,9% of the isolates produced biofilm *in vitro* by the adherence in sterile 96-well “U” bottom polystyrene tissue culture plates. 95,7% of isolates possessed the *icaA* and *icaD* genes. The results of *in vitro* antibiotic susceptibility assay to 12 different antibiotics revealed that seven isolates were resistance to follow antibiotics: clorphenicol, clindamicin, erythromycin, gentamicin, oxacillin and penicillin, the higher resistance occurred to penicillin (6,6%) and gentamicin (2,2%). In the study of phenotypic tests compared with genotypic test, the 96-well polystyrene tissue culture plates assay was the most sensitivity (100%) and is recommended with genotypic test for the investigation biofilm formation in *S. aureus*. All the tests, exception of antibiotic susceptibility assay were statistically significant ($p<005$).

Keywords: biofilms, bovine mastitis, *icaAD* genes, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus são importantes agentes etiológicos que causam infecções intramamárias em ruminantes e estão associados a várias formas de mastite clínica e subclínica no rebanho leiteiro. Estima-se uma perda muito grande na pecuária com a mastite bovina, além do que a virulência dos *S. aureus* na mastite depende da produção de exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares contendo várias camadas.

As adesões dos *S. aureus* ao epitélio da glândula mamária são consideradas o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite sendo que a maioria das estirpes dos *S. aureus* que causam mastite são circundadas por uma camada espessa ("slime"), que ajuda na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (BASELGA et al., 1993; AGUILAR et al., 2001). A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio tem sido associada à produção de biofilmes, composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz.

Os biofilmes são agregados de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre microcolônias. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de microrganismos por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos.

Os biofilmes podem ser benéficos, como para produção de vinagre e tratamento de resíduos, assim como podem ser maléficos no que concerne à corrosão de metais nos quais o biofilme está localizado ou quando biofilmes formados por bactérias deterioradoras ou patogênicas podem gerar perdas para a indústria e tornar o produto veiculador de doenças.

Algumas estirpes produtoras de biofilmes têm uma significativa capacidade de colonização quando comparadas com as estirpes não produtoras e variantes. (BASELGA et al., 1993). Os biofilmes formados por *S. aureus* isolados de mastite estão associados à redução da susceptibilidade a antimicrobianos, fato este atribuído a baixa

difusão de antimicrobianos na matriz e a baixa atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes.

Os biofilmes são também considerados exopolissacarídeos, com uma matriz espessa, conhecida como “slime” rodeados de multicamadas de células sendo que a produção dessa matriz está sobre um controle poligênico (JEFFERSON, 2004). A cápsula é uma camada polissacarídea que protege as bactérias contra a fagocitose e outras defesas do organismo e para fagocitar uma bactéria possuidora de envoltório capsular é necessário que o organismo tenha anticorpos específicos contra os polissacarídeos capsulares.

Tem sido estudada a utilização de antígenos capsulares de *S. aureus* como vacina devido ao fato desses antígenos reforçarem a habilidade dos fagócitos responderem a essas infecções (SORDELLI et al., 2000). Algumas evidências sugerem que a capacidade genética dos *S. aureus* para produção de biofilmes tem aumentado a habilidade destes microrganismos em iniciar e causar infecções intramamárias persistentes, além de proteger as bactérias contra a fagocitose.

Além da habilidade dos *S. aureus* produzirem biofilmes ser um dos fatores de virulência para a mastite, os biofilmes também são uns dos problemas em relação ao tratamento das infecções por permitir que microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos e da fagocitose pelo sistema imune, o que torna a mastite subclínica persistente. Devido à ausência de pesquisas relacionadas a presença de *S. aureus* produtores de biofilmes em casos de mastite subclínica no Brasil hipotetizou-se a realização deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Mastite na Bovinocultura Leiteira

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

A preocupação com a mastite 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 (FONSECA & SANTOS, 2000; REIS et al., 2005). O centro nacional de controle da mastite nos Estados Unidos (NMC) estimou em 2002 uma perda monetária de aproximadamente US\$ 2 bilhões (USDA, 2002 citado por VASUDEVAN et al, 2003).

Embora muitos patógenos bacterianos, como algumas bactérias do grupo coliformes, possam estar relacionados ao ambiente que os animais vivem, existem aqueles altamente associados à glândula mamária e a pele do teto, como os *S. aureus* que emergiram como um dos microrganismos mais prevalentes na maior parte do mundo (TOLLERSRUD et al., 2000).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação das alterações no leite e da presença de sinais da inflamação como a presença de dor, edema no úbere e modificação das características da secreção do leite. No entanto, a mastite subclínica pode ser melhor caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS), devido ao influxo de leucócitos, uma vez que tanto o úbere quanto o leite estarão aparentemente normais. O exame bacteriológico do leite, obtido em um único quarto ou em todos os quartos mamários é o procedimento para estabelecer se o úbere está infectado. Em surtos de mastite clínica no rebanho, ou em casos individuais,

o isolamento dos agentes etiológicos é o método de diagnóstico de eleição, sendo útil, no monitoramento dos mesmos (BRITO et al., 2002).

2.1.2 California Mastitis Test

O método mais utilizado para auxiliar o diagnóstico da mastite subclínica é o “California Mastitis Test” (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957). Este teste estima o número de células somáticas no leite, sendo que, as principais vantagens deste método podem ser atribuídas a elevada concordância com o exame bacteriológico, o reduzido número de resultados falso-negativos além de ser um método de fácil aplicação e baixo custo. (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 resultado do CMT é dado como negativo, suspeito, fracamente positivo e fortemente positivo (BRITO et al., 2002).

2.1.3 Mastite X Tratamento

Estudos epidemiológicos revelaram que no tratamento com agentes antimicrobianos a cura bacteriológica pode alcançar 80% dos casos, dependendo da idade, número de parições, período de lactação, contagem de células somáticas e outros fatores (WILSON et al., 1999). O tratamento no período seco atingiu resultados de cura bacteriológica de 90 - 100% (OWENS et al., 2001), e em contraste as vacas em lactação que foram tratadas obtiveram cura bacteriológica de 0-52%. O tratamento de vacas mais velhas com alta contagem de células somáticas obteve menos sucesso que o tratamento de vacas jovens com altas contagens de células somáticas além de ser baixa eficiência dependendo dos patógenos presentes (DELUYKER et al., 1999; SHEPHARD et al., 2000). Por exemplo, os *Staphylococcus aureus* foram refratários ao tratamento (WILSON et al., 1999) e para infecções por: *Streptococcus dysgalactiae*,

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* as taxas de cura variaram de 33 -100%. (HILLERTON & KLIEM, 2002; WILSON et al, 1999).

Estudos epidemiológicos sugeriram que 40% dos casos de mastite foram recorrentes após o fim do tratamento. (HILLERTON & KLIEM, 2002). A probabilidade da mastite clínica reaparecer no mesmo quarto, no mês seguinte, é de 4,8 vezes maior se a primeira terapia não for terminada com sucesso. (HOUBEN et al., 1993). Se a primeira infecção ocorreu na lactação anterior, o risco de infecções recorrentes é baixo.

Em geral, a terapia utilizada para mastite é o uso de antimicrobianos para combater a infecção latente. Vários relatos de testes de susceptibilidade confirmaram que na última década patógenos isolados de casos de mastite têm permanecido susceptíveis aos agentes antimicrobianos (ERSKINE et al., 2002; ROSSITO et al., 2002), entretanto, o sucesso da terapia da mastite, desaponta em muitos casos, não melhorando a saúde do úbere, e as contagens de células somáticas aumentam ou, se diminuem começam a aumentar em um curto espaço de tempo.

Considerando a baixa eficiência da terapia, relacionada à resistência intrínseca dos microrganismos e não a resistência adquirida, por patógenos comuns, e nenhuma mudança na farmacocinética e na formulação dos agentes antimicrobianos, outros fatores têm sido identificados por proteger patógenos do ataque de agentes antimicrobianos. Uma das hipóteses mais convincentes para explicar a resistência à terapia é a habilidade dos estafilococos tão bem quanto os outros microrganismos se multiplicarem e formarem biofilmes em tecidos infectados, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos (MELCHIOR et al., 2005).

A aderência de patógenos na mastite foi investigada “in vitro” e “in vivo” (AGUILAR et al., 2001; ALMEIDA et al., 1999; 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.

2.2 *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus aureus*

O leite é um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos e entre os agentes etiológicos causadores de mastite, destacam-se os de origem contagiosa e os ambientais. Segundo Mendonça et al. (1999), apesar da grande variedade de agentes infecciosos isolados a partir da glândula mamária, existem alguns que são predominantes, como é o caso dos estafilococos e estreptococos.

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isolados na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos (KLOOS & BANNERMAN, 1999). Desde a sua proposição em 1884 por Rosenbach, o gênero *Staphylococcus* tem sido classificado na família *Micrococcaceae*. Foi somente na última década, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S que o gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: *Staphylococcaceae* (GARRITY e HOLT, 2001). Atualmente já são 40 espécies descritas no gênero (BANNERMAN, 2003; EUZÉBY, 2007), a maioria coagulase-negativo, caracterizando-se a exclusividade da síntese desta enzima aos *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003).

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não de gás, não fotossintético, não esporulado, catalase-positivos e capazes de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos 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*. Esses fatores incluem as hemolisinas α , β , γ , δ , a leucocidina e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos. (BANNERMAN, 2003).

S. aureus destacam-se como microrganismos causadores de mastites contagiosas de maior importância, maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antimicrobianos. 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. O risco à saúde humana está associado ao consumo de leite dos rebanhos infectados, uma vez que a maioria dos casos de mastite diagnosticados é de mastite subclínica. (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

MOTA et al. (2004) verificaram uma frequência de 59,27% de amostras de leite positivas ao CMT e 81,63% positivas ao exame microbiológico, destacando-se como microrganismos prevalentes os *Staphylococcus* spp (52,16%) em propriedades no estado de Pernambuco.

FERREIRA, (2004), encontrou 77 estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite, procedentes de 40 vacas da raça holandesa, que apresentaram mastite subclínica, em uma propriedade rural no estado de São Paulo. Encontrou também 4 padrões distintos de *S. aureus* resistentes aos agentes antimicrobianos e 9 padrões de ribotipos diferentes em uma mesma propriedade, mostrando assim a heterogeneidade genética dos *S. aureus* nas mastites bovinas.

ALMEIDA et al. (2005), em propriedades na região do sul de Minas Gerais analisaram amostras de leite provenientes de 96 rebanhos, sendo que as maiores frequências de isolamentos foram de *S. aureus* (64,55%) seguido do *Streptococcus agalactiae* (52%).

COSTA et al. (2005), verificaram a ocorrência de microrganismos em quartos mamários negativos ao CMT e ao exame de Tamis, evidenciando a ocorrência de 45,1% de quartos mamários portadores, sendo considerado portadores os quartos que foram positivos ao exame microbiológico e negativos ao CMT. Foram estudadas 87.039 glândulas de 148 propriedades leiteiras no estado de Minas Gerais e São Paulo, sendo que 8,1% dos isolados foram *Staphylococcus* sp (55% foram coagulase negativo).

PEREIRA et al. (2007), avaliaram a ocorrência de mastite subclínica em 31 rebanhos no Sul do estado de Minas Gerais verificando que, entre as 2.368 vacas submetidas ao CMT os principais patógenos isolados foram: *Staphylococcus* coagulase-positivos (35,57%), *Streptococcus agalactiae* (21,33%), *Staphylococcus* coagulase-negativos (7,37%), *Corynebacterium* sp (15,53%) e outros (20,2%).

2.3 Biofilmes

2.3.1 Conceito

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 microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálice (COSTERTON et al., 1999).

2.3.2 Composição dos Biofilmes

A matriz de polímeros extracelulares de natureza polissacarídica ou protéica, conhecida como glicocálice, expõe-se exteriormente à membrana externa das células gram-negativas e ao peptideoglicano das células gram-positivas. A matriz 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).

A adesão superficial dos microrganismos forma o glicocálice, que sobrevive a ambientes hostis, de modo a bloquear e reter os nutrientes necessários para o crescimento 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 microrganismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros microrganismos. Sendo assim, nos biofilmes os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos como os 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).

2.3.3 Teorias da Formação de Biofilmes

Existem várias teorias para a formação de biofilmes e a primeira delas foi descrita por Marshall et al. (1971), a qual relata que a adesão em superfícies é um processo que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, pois os microrganismos estão fracamente aderidos à superfície por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática, o que promove uma fácil remoção das células bacterianas. Na segunda etapa, o processo é irreversível, depende do tempo de aderência e envolve adesão física das células com as superfícies por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida pelas bactérias, denominado glicocálice, que suporta a adesão de biofilmes.

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).

Uma terceira teoria proposta por Dormans et al. (1991) citado por Zotolla (1997), indica a formação dos biofilmes em três etapas que seria a fixação das bactérias

seguida pela consolidação das bactérias nas superfícies e, por último, a colonização e a multiplicação das bactérias nas superfícies. Na etapa de consolidação ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos microrganismos.

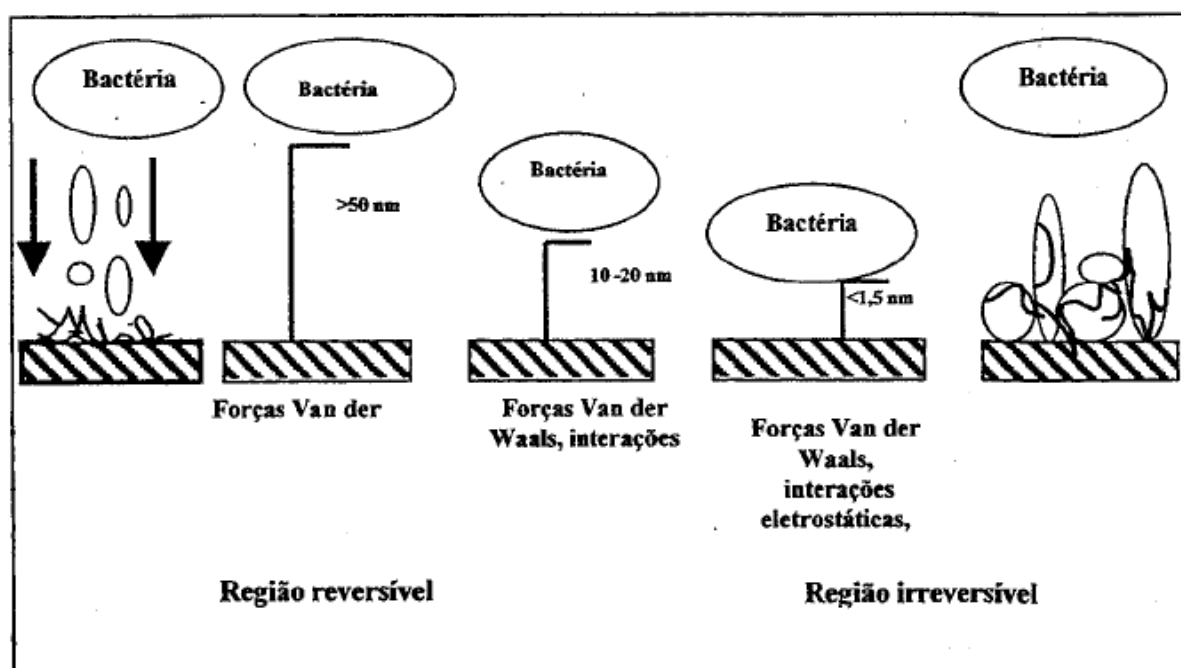
2.4 Aderência Bacteriana

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. Essas interações podem levar a uma ligação essencialmente irreversível. A interação específica é uma interação microscópica, como a interação entre um componente da superfície da célula e o substrato ocorre a uma distância extremamente curta e permite ligações específicas 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, 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 $1,5\text{nm}$ (MARQUES, 2005).

Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos 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 microrganismos. A produção de exopolissacarídeo (EPS) aumenta com as adesões das bactérias às superfícies, caso as células dos biofilmes sejam reinoculadas no meio como células planctônicas, haverá redução na produção de EPS (KUMAR & ANAND, 1998).



Adaptado de Busscher & Weerkamp (1987), Characklis (1984), Marshall (1971), Notermans (1994), citados por Zotolla (1997).

FIGURA 1 Representação esquemática das interações envolvidas na adesão bacteriana a um substrato sólido.

2.4.1 Fatores que influenciam a adesão bacteriana

Vários fatores podem influenciar a adesão dos microrganismos às superfícies como fase de multiplicação da célula, o tipo e as propriedades dos materiais, a presença de matéria orgânica, o pH e a temperatura do meio que envolve os microrganismos. (POMPERMAYER & GAYLARDE, 2000).

As células bacterianas possuem cargas negativas em potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3, sendo que as bactérias gram-positivas tem uma carga negativa que é originária dos ácidos teicóicos e teiurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálice, e nas bactérias gram-negativas essa carga negativa é originária dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto com os polímeros do

glicocálice. Estudos recentes sugerem que a baixa multiplicação das células dentro dos biofilmes é causada em resposta ao stress iniciado pela multiplicação das mesmas dentro dos biofilmes sendo que células bacterianas sob inanição, que não estão utilizando os nutrientes nos biofilmes, causam queda na sua multiplicação. Na fase exponencial a multiplicação dos microrganismos ou a sua paralisação são acompanhadas pelo aumento na resistência aos antimicrobianos (MARQUES, 2005).

Tanto as bactérias quanto os substratos adquirem cargas superficiais (geralmente negativas) como resultado da adsorção de íons e, ou a ionização de superfície. Quando as bactérias se aproximam dos substratos interações começam a se desenvolver através da formação de substâncias exopoliméricas que formam uma ponte entre os microrganismos e os substratos, embora a produção destas substâncias extracelulares não dependa das mesmas interações eletrostáticas (ZOTTOLA & SASAHARA, 1994; FIGUEIREDO, 2000).

A composição dos biofilmes é heterogênea, devido à presença do grande número de variados microrganismos com várias propriedades fisiológicas e metabólicas como resposta ao pH e requerimentos nutricionais ocorrendo dentro da matriz polimérica, além do que, a distribuição destes microrganismos dentro dos biofilmes não é uniforme podendo ocorrer interdependência entre as espécies o que contribui para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos, e a multiplicação dos microrganismos na matriz é intercalado por canais de água altamente permeáveis. (MORTON et al., 1998; MARQUES, 2005).

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. Muitos polímeros das matrizes são de natureza aniônica, assim podem se ligar aos cátions e proporcionar a reserva destes nutrientes, o que faz com que as matrizes funcionem como reserva de energia e carbono. Devido à proximidade das células microbianas nas matrizes dos biofilmes, a competitividade por nutrientes disponíveis é muito grande, por isso, os agentes microbianos que entram nas matrizes acabam destruindo as células vizinhas (SUTHERLAND, 2001; MARQUES, 2005).

As estruturas das comunidades dos biofilmes variam com a localização, a natureza dos microrganismos e a disponibilidade dos nutrientes. As células colonizadas produzem polissacarídeo extracelular e migram até as superfícies dos biofilmes lentamente formando juntas pequenos agrupamentos, estruturas em forma de cogumelo, e canais cheios de água são formados entre estas pequenas colônias, constituindo sistema circulatório primitivo, distribuindo nutrientes e removendo produtos desnecessários para as comunidades de células nas microcolônias (SUTHERLAND, 2001; MARQUES, 2005; CLUTTERBUCK et al., 2007).

Colonizadores primários são os microrganismos que aderem primeiro à superfície, favorecendo a adesão de espécies compatíveis. A presença dos colonizadores primários inibe, mas não impede a aderência de outras bactérias, e modifica as características da superfície aderida pela sua multiplicação, contribuindo para a adesão de bactérias secundárias, detritos orgânicos, minerais e outros (BEECH & SUNNER, 2004).

2.4.2 Mecanismo de adesão dos *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus sp em especial o *Staphylococcus aureus*, produzem uma ampla variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizarem e de causarem doenças em hospedeiros mamíferos e aves. Quase todas as estirpes secretam enzimas e citotoxinas, as quais incluem hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e colagenase. A principal função destas proteínas é converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários a sua multiplicação, sendo que algumas estirpes produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, as quais incluem a toxina da síndrome do choque tóxico, as enterotoxinas estafilocócicas (SE), as toxinas esfoliativas e a leucocidina (DINGES et al., 2000).

Staphylococcus aureus produzem duas proteínas associadas com a parede celular que se ligam a fibronectina (Fn) e são chamadas de *FnBPA* e *FnBPB*. Os mutantes de *S. aureus* que não possuíam o gene *fnbA* ou *fnbB* foram efetivos em aderir a superfície, porém o duplo mutante para *fnbA* e *fnbB* foi deficiente na adesão e se um

dos dois tipos de genes for fornecido por plasmídeos, então a adesão é restaurada (DALTON & MARCH, 1998; CUCARELLA et al., 2001).

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 locus *ica* do operon *icaABCD* e os genes e produtos do locus *ica* foram demonstrados fundamentais para a formação de biofilmes e virulência dos microrganismos e são regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, limitação de etanol e ferro (O' TOOLE et al., 2000; STANLEY & LAZAZZERA, 2004 citado por MARQUES, 2005).

O polissacarídeo capsular adesina PS/A é responsável pela adesão primária à superfície celular e sua síntese é controlada pelo locus *ica*, em seguida multicamadas de células são formadas devido a produção do polissacarídeo intercelular adesina (PIA) também controlado pelo locus *icaADBC*. Foi demonstrado que os genes *icaA* e *icaD* tem importante papel na formação dos biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003).

O *quorum-sensing* dos *S. aureus* é um sistema de comunicação bacteriana sobre a densidade de células presentes nos biofilmes, e o locus responsável é o locus *agr* que consiste em 4 genes (*agrA*, *agrC*, *agrD*, *agrB*), sendo que este locus 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 (VOUNG et al., 2000; JEFFERSON, 2004).

2.5 Constituição da Matriz de Exopolissacarídeos

Os polissacarídeos bacterianos têm sido objetos de estudo principalmente por suas propriedades, como as interações parasito-hospedeiro, como determinante imunológico ou por sua capacidade adesiva e representam 65% do material extracelular (CHRISTENSEN, 1989; citado por BERNADI, 2005).

Os polissacarídeos podem ser classificados de acordo com sua fonte, biossíntese, estruturas, propriedades físicas (características de adsorção, solubilidade,

trocas iônicas, viscosidade, formação de gel e interação polímero-polímero) ou biológicas.

Os componentes extracelulares e de superfície celular mais comum são a glicose, galactose, manose, fucose, ramnose, glicosamina, galactosamina, ácido glicurônico e galacturônico, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (CHRISTENSEN, 1989; citado por BERNADI, 2005).

Muitas moléculas têm sido identificadas com o envolvimento direto do processo de adesão célula a célula e é possível colocá-las em dois maiores grupos: carboidratos poliméricos e proteínas poliméricas e, bioquimicamente, a adesina polissacarídica extracelular tem função essencial na aderência inicial e na adesão intercelular (formação dos biofilmes) (MORALES et al., 2004; ZHANG et al., 1998).

Há vários outros polissacarídeos que compõe o “slime”, mas um polissacarídeo específico de alto peso molecular que tem a mesma função da cápsula bacteriana e intervém a aderência inicial das bactérias nas superfícies dos polímeros é chamado de polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) (ARCIOLA et al., 2001; GOTZ, 2002) e é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme protegendo as bactérias das defesas do hospedeiro e da fagocitose e está envolvido no primeiro passo da adesão primária, acompanhada da proliferação das células em agrupamentos de multicamadas (ARCIOLA et al., 2001; FARBER et al., 1990; GERKE et al., 1998; HANDKE et al., 2004). Hoje, o PS/A é conhecido como PNAG (poli-succinil-glicosamina) e estudos o descrevem como um forte candidato na produção de vacina contra doenças estafilocócicas (BALDASSARI et al., 1996; HANDKE et al., 2004).

Em um segundo passo, há a formação de grandes grupos celulares que são associados com a produção do polissacarídeo intercelular/adesina chamado de PIA que é um homopolímero linear de até 130 resíduos de b-1,6-glicosamina N-acetilado (15% a 20% diacetilados) composto por duas frações polissacarídicas: polissacarídeo I (>80%) e polissacarídeo II (< 20%) estruturalmente relacionado ao polissacarídeo I com baixa quantidade de resíduos não N-acetilados D-glicosamina, fosfato e éster ligado a succinato, sendo aniônico (MORALES et al., 2004). O PIA é localizado na superfície celular mediado por produtos do gene cromossômico *ica* (intercelular adhesion) que

corresponde a quatro genes de adesão intercelular, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, e um gene regulador, *icaR* organizados em uma estrutura operon envolvidos na produção deste polissacarídeo e codificam quatro proteínas que são necessárias para a síntese do PIA que são, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (ARCIOLA et al., 2001; CAFISO et al., 2004; CONLON et al., 2002; FITZGERALD et al., 2005; JOHANNES et al., 2001 GERKE et al., 1998; GOTZ, 2002).

O PIA é envolvido no acúmulo celular dos *Staphylococcus* sp nas superfícies, na hemaglutinação e também age na adesão intercelular em vidro e outras superfícies hidrofílicas e é distinto do PS/A. Também é descrito que o PS/A e o PIA dividem em sua constituição um mesmo arranjo de b-1-6-glicosamina diferindo em um substituinte primário no grupo amino e tamanho molecular, mostrando que ambos são produzidos de proteínas codificadas no locus *ica*. A síntese do polissacarídeo capsular-PS/A é mediada por um operon *ica* que uma vez ativado, um polissacarídeo de adesão intercelular-PIA é sintetizado (ARCIOLA et al., 2001).

O gene *icaA* representa atividade catalítica N-acetilglicosaminatranferase e que sozinha tem baixa atividade transferase mas, quando é co-expressa com o gene *icaD* apresenta atividade total sintetizando resíduos longos de 10-20 oligômeros de b 1,6-N-acetil glicosamina (DOBINSKY et al., 2002; GALDBART et al., 2000; GOTZ, 2002). Longos oligômeros de até 130 resíduos são formados na presença do gene *icaC*, e o gene *icaB* está presente principalmente no sobrenadante das culturas e codifica uma proteína que catalisa reações de diacetilação durante a biossíntese do PIA e é secretado quando da necessidade de *icaC* que sintetiza longos oligômeros, sendo que o gene *ica C* não tem atividade bem definida, mas deve estar envolvida no transporte transmembrana por ser uma proteína integrante da membrana, não tendo atividade essencial para a síntese do PIA (DOBINSKY et al. , 2002; GOTZ, 2002).

2.6. Fase de variação

O fenômeno fase de variação, colônias de *S. aureus* produtoras de “slime” foram capazes de após novo cultivo no Agar Vermelho Congo (CRA) não produzirem mais “slime” e colônias não produtoras se tornaram produtoras, foi primeiramente descrito por Baselga et al. (1993) referindo-se aos *S. aureus* isolados de casos de mastite. No referido trabalho foi descrito as diferenças entre estirpes produtoras de “slime” (SP) e não produtoras de “slime” (NSP), que se multiplicaram no Agar Vermelho Congo. Com repetidos sub-cultivos foi possível converter estirpes não produtoras de “slime” em estirpes produtoras de “slime” e vice-versa.

Pesquisas feitas por Conlon et al. (2004) demonstraram que a fase de variação está sob regulação do locus *icaADBC* e ocorre quando esses genes são inativados ou tem baixa regulação na expressão gênica, sendo que, esta fase de variação representa um importante mecanismo que facilita a saída das células livres dos biofilmes. Essa saída das células dos biofilmes resultou na ativação da expressão do gene por meio de adesão, toxinas e rápida multiplicação, e esse estágio é frequentemente acompanhado por recorrência da infecção.

2.7 Resistência dos microrganismos nos biofilmes aos componentes do sistema imune

Os exopolímeros formados nos biofilmes protegem as bactérias de componentes do sistema imune. “Slime” extracelular produzido por *S. epidermidis* protegeu células da atividade fagocitária de macrófagos e contra opsoninas assim como a espécies reativas ao oxigênio em leucócitos polimorfonucleares (YASUDA et al., 1994).

Uma baixa atividade bactericida dos neutrófilos foi observada contra estirpes de *S. aureus* produtoras de “slime”. (BARRIO et al., 2000).

2.8 Resistência dos microrganismos nos biofilmes aos agentes antimicrobianos

A farmacodinâmica e a farmacocinética dos agentes antimicrobianos usados na terapia da mastite têm sido discutidos em relação a aparente resistência da terapia. A aplicação parenteral de antimicrobianos depende de muitos fatores na passagem dos agentes do sangue para o leite tais como: soro proteína ligante, lipossolubilidade e valores de pKa. Além de proteínas do leite ligantes, a inativação por íons quelantes (Ca e Mg) no leite influencia a terapia antimicrobiana (DU PREEZ, 2000).

A composição da terapia determina se níveis efetivos ou não efetivos de antimicrobianos no tecido mamário são alcançados na administração intramamária. Além disso, a distribuição do agente antimicrobiano no tecido mamário pode ser impedida por mudanças patológicas como, por exemplo, necrose e isquemia, não permitindo que o antimicrobiano chegue ao local de atuação (SHOSHANI et al, 2000).

S. aureus, intracelular em leucócitos polimorfonucleares (PMF), mostrou longos períodos de replicação tornando-se menos susceptível aos antimicrobianos, que exercem limitados efeitos bactericidas em microrganismos que não estão se dividindo, como as penicilinas e cefalosporinas (YANCEY et al., 1991).

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). Um estudo comparativo com 11 antimicrobianos, calculado de acordo com a concentração-dependente de ação contra biofilmes imaturos (6h) e biofilmes maduros (18h) formados pela multiplicação dos *S. aureus* em caldo ou em leite mostrou que em geral, antimicrobianos tiveram um melhor efeito em biofilmes imaturos e também naqueles que se multiplicaram no leite, que em biofilmes maduros e também naqueles que multiplicaram em caldo (AMORENA et al., 1999). Esse experimento também mostrou que a gentamicina e a eritromicina foram os antimicrobianos menos efetivos contra *Staphylococcus aureus* nos biofilmes.

Estudos “in vitro” demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se de 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 microrganismos 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, mudanças fisiológicas com o crescimento dos biofilmes incluindo as células persistentes.

A matriz de exopolissacarídeo funciona como barreira aos agentes antimicrobianos (STEWART, 1996).

ANDERL et al, (2000) mostraram que a ampicilina não foi capaz de penetrar nos biofilmes formado por *Klebsiella pneumoniae* e alguns mutantes deficientes de β -lactamase multiplicaram em biofilmes e foram resistentes a ampicilina. Uma correlação positiva entre a espessura dos biofilmes e sua resistência a antimicrobianos foi observada (AMORENA et al., 1999; MONZON et al., 2001, 2002).

Uma baixa taxa de multiplicação das bactérias foi observada (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 microrganismos, 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 antimicrobianos 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 antimicrobianos 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, uma maior concentração de agentes antimicrobianos não aumentou o efeito

bactericida. Este 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 (LEWIS, 2001). As bactérias removidas dos biofilmes foram tão sensíveis quanto as células livres primárias (ANDERL et al., 2003).

Estudos evidenciaram que os antimicrobianos não foram somente menos efetivos nos biofilmes, mas também estimularam a formação dos mesmos. Para três classes de antimicrobianos, incluindo as tetraciclinas, quinopristina e eritromicina a expressão dos genes *ica* foram estimuladas, e a indução desses genes por antimicrobianos promoveu a aderência das bactérias as superfícies biológicas e estimulou a formação de biofilmes. Concentrações mínimas de antimicrobianos podem influenciar na expressão de fatores de virulência importantes como a adesão de moléculas e produção de toxinas (RACHID et al. 2000).

Uma das formas de se melhorar as taxas de curas bacteriológicas é estender a duração da terapia (SOL et al., 2000). O tratamento das infecções por *S. aureus* por 3-4 dias resultou em 29% de cura bacteriológica, enquanto que o tratamento por 5 dias resultou em 42% de cura (PYORALA, 1998). A extensão da terapia de 3-6 dias melhorou as taxas de cura da infecção por *S. uberis* de 60% para 70-80% respectivamente (HILLERTON & KLIEM 2002).

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

2.9 Pesquisas de avaliação da produção de biofilmes

A capacidade dos *S. aureus* em formarem biofilmes “in vivo” é considerada o maior fator de virulência na patogenia da mastite. Foi realizado um estudo que avaliou a capacidade de formação de biofilmes “in vitro” e a presença do locus *ica* e genes *icaA* e *icaD* em 35 estirpes de *S. aureus* oriundos de casos de mastite, sendo que 32 (91,4%) destas estirpes produziram “slime” no Agar Vermelho Congo, enquanto que apenas 24 (68,57%) produziram biofilmes “in vitro”. Entretanto, todas as 35 (100%) estirpes foram positivas para os genes *icaA* e *icaD*, esse estudo mostrou uma alta prevalência dos genes *icaA* e *icaD* em *S. aureus* isolados de mastite, sendo recomendado a combinação dos testes genotípicos e fenotípicos para a investigação de biofilmes (VASUDEVAN et al., 2003).

BERNADI, (2005), avaliou estirpes hospitalares de *Staphylococcus* coagulase negativos isoladas de cateteres quanto a habilidade da produção de biofilmes sobre superfícies abióticas (cateter esterilizado), antibiograma e a presença de genes *icaAD*. Foram analisadas 27 estirpes *Staphylococcus* coagulase-negativos (10 *Staphylococcus epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 2 *S. hominis*, 2 *S. lugdunensis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. schleiferi*, 2 *S. xylosus* e 4 *S. warneri*). Os genes *icaAD* foram detectados em dez estirpes *S. epidermidis*. A habilidade de formar *slime* foi testada em placas contendo ágar vermelho Congo, no qual foram observadas colônias negras em 10 estirpes de *S. epidermidis*, 4 de *S. haemolyticus*, 4 de *S. warneri*, 2 de *S. xylosus* e 1 de *S. chromogenes*. A aderência dos *Staphylococcus* coagulase-negativos ao poliestireno foi observada em 19 estirpes, incluindo: 10 de *S. epidermidis*, 3 de *S. haemolyticus*, 3 de *S. warneri*, 2 de *S. xylosus*, 1 de *S. chromogenes*. O antibiograma mostrou que 100% *Staphylococcus* coagulase-negativos eram sensíveis a vancomicina e 88,88% resistentes a pencilina.

A detecção de *slime*, e a habilidade de aderir e formar biofilmes foi observada na maioria das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos sugerindo elevada ocorrência de estirpes com potencial patogênico em ambiente hospitalar. As mesmas estirpes que produziram *slime* foram resistentes a oxacilina e formaram biofilmes, eram

também resistentes a mais de seis antimicrobianos. A presença dos genes de adesão intercelular (*icaAD*) foi detectada na maioria das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos, exceção para *S. saprophyticus* e *S. scheleiferi*, sugerindo que estas estirpes não tem homologia com *S. epidermidis*.

Estirpes de *S. aureus* foram investigadas quanto a presença do locus *ica* e sobre sua influência na formação de biofilmes. A produção de biofilmes “in vitro” pelo teste aderência em placas ocorreu em 78% das estirpes positivas para o gene *icaA* e de 59% para o gene *icaD*, e a deleção do *ica* locus resultou na perda da habilidade de formar biofilmes. Outros experimentos revelaram que a presença do *icaA* em muitas espécies de *Staphylococcus*, está correlacionado com a adesão célula-célula e o potencial de formar biofilmes está relacionado a este gene. (CRAMTON et al, 1999).

Estudou-se a presença dos genes *icaA* e *icaD* em uma coleção de 91 estirpes de estafilococos (68 *S. epidermidis* e 23 *S. aureus*) de infecções associada a catéteres venosos e em 10 estirpes de pele e mucosa de voluntários sadios. A habilidade de formar “slime” foi testada no agar vermelho congo. Para o *S. epidermidis* 49% das estirpes foram positivas para a formação de “slime” e para a presença dos genes *icaA* e *icaD* e para o *S. aureus* 61% das estirpes foram positivas para produção de “slime” e a presença dos genes *icaA* e *icaD*. (ARCIOLA et al., 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL:

Verificar a capacidade produtora de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de casos de mastite subclínica bovina.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Confirmar as estirpes de *S. aureus* isoladas pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Avaliar as produções de “slime” através da morfologia dos *S. aureus* apresentada no Agar Vermelho Congo (CRA).
- Determinar a habilidade dos *S. aureus* produzirem biofilmes "in vitro" pelo método de aderência em microplacas.
- Identificar os genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Avaliar o perfil de sensibilidade e resistência das estirpes de *S. aureus* frente aos antimicrobianos.
- Avaliar a concordância, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo entre os testes fenotípicos (Agar Vermelho Congo, Teste de aderência em placas e perfil de sensibilidade e resistência dos *S. aureus* frente aos antimicrobianos) e o teste genotípico (presença dos genes *icaAD*) e também avaliar os parâmetros citados acima entre o teste de aderência em placas e a morfologia no Agar vermelho congo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras de leite

4.1.1 Propriedade A

4.1.2 Características da propriedade rural e do rebanho

Foram colhidas amostras de leite oriundas de 40 vacas aparentemente saudáveis, porém reagentes ao Califórnia Mastitis Test em uma propriedade rural produtora de leite tipo C situada no município de Colina/SP. Este rebanho era constituído por vacas mestiças 7/8 holandesas, variedade preta e branca, ordenhadas mecanicamente uma vez ao dia, sendo adotado o sistema de “balde ao pé”, cuja produção global média situou-se em torno de 400 litros diários.

4.1.3 Propriedade B

4.1.4 Características da propriedade rural e do rebanho

Foram colhidas amostras de leite oriundas de 80 vacas aparentemente saudáveis, porém reagentes ao CMT, em uma propriedade rural produtora de leite tipo B pertencentes ao Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo, órgão da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio. O rebanho leiteiro era constituído por vacas P.O., holandesas e pardo-suíças, cuja produção global média situava-se em torno de 1200 litros diários cuja ordenha era efetuada mecanicamente em sistema de circuito fechado, sendo realizada duas vezes ao dia.

4.2 Seleção dos animais

Em ambas as propriedades todas as vacas lactantes aparentemente sadias foram submetidas mensalmente à prova do *California Mastitis Test* (CMT). Investigou-se também a presença de animais com quadro clínico de mastite, sendo desconsideradas as vacas que apresentavam 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 apresentassem sinais evidentes da presença de mastite clínica.

4.3 Propriedades A e B

4.3.1 Realização da prova do “Califórnia Mastitis Test” (CMT)

Após a lavagem dos tetos com água corrente e secagem com papel toalha foram desprezados os três primeiros jatos de leite, em seguida, colhidos cerca de dois mililitros em uma bandeja plástica apropriada contendo quatro compartimentos circulares distintos. Depois do escoamento do excesso de leite efetuado por inclinação da bandeja, adicionava-se igual quantidade do reagente, tendo-se o cuidado de evitar a formação de espuma. A homogeneização foi efetuada com movimentos circulares e uniformes, durante 10 a 15 segundos, quando se realizavam as leituras e a interpretação da prova. Assim foram consideradas positivas as misturas (leite + reagente) que apresentavam evidente formação de gel viscoso, acompanhadas ou não pela coloração violeta, e negativas as misturas que permaneceram inalteradas, ou seja, sem a clara evidenciação de viscosidade (SCHALM E NOORLANDER, 1957).

4.3.2 Amostras de leite dos quartos mamários para 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) utilizou-se tubos de ensaio esterilizados para acondicionar amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, em duplicatas, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Os tubos contendo as amostras foram colocados em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e levados ao laboratório de Análises de Alimentos e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - UNESP – Jaboticabal-SP, e Laboratório do Centro de Pesquisas do Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo na cidade de Nova Odessa-SP para isolamento e identificação bacteriana.

4.3.3 Isolamento e Identificação das estirpes de *Staphylococcus aureus*.

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram isoladas seguindo o procedimento indicado abaixo, sendo que na presente pesquisa estas estirpes já tinham sido previamente isoladas de acordo com a metodologia descrita abaixo.

Foram semeados dez microlitros das amostras de leite de cada quarto mamário sobre a superfície do Agar Sangue de carneiro a 5% (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), em placas de Petri, em duplicatas e depois as placas foram incubadas à 37°C durante 24 a 48 horas. Após a incubação colônias sugestivas de microrganismos 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).

4.3.4 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* 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 a cada uma hora logo após a primeira hora até completar 4 horas. Foram consideradas estirpes positivas aquelas que coagularam o plasma, formando um coágulo visível. (MAC FADDIN, 1976).

4.3.5 Teste da Catalase

Com uma alça de semeadura flambada retirou-se uma colônia pura de cultivo de *S. aureus* (24hs cultivo). Logo após, foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa. Adicionou-se uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% sobre o esfregaço na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976).

4.3.6 Preparação Caldo MRVP

O meio desidratado foi adicionado à água destilada na proporção de 17 gramas por litro e a mistura homogeneizada até a completa dissolução. A seguir o caldo foi distribuído em tubos (10X100mm) na quantidade de 2,5mL e estes esterilizados a 121° C por 15 minutos. Os tubos foram mantidos à 4°C até o momento do uso.

4.3.6.1 Reativo de Barrit (MAC FADDIN, 1976).

Solução de alfa-naftol 5%

Alfa-naftol (5,0 gramas) e álcool etílico absoluto (100mL). Dissolveu-se o alfa-naftol no álcool etílico e armazenou-se em um frasco escuro na geladeira a 4°C.

Solução de hidróxido de Potássio 40% q.s.p

Foram dissolvidas 40 gramas de hidróxido de potássio em 100mL (q.s.p) de água destilada e a solução foi armazenada em frasco escuro sob refrigeração.

4.3.6.2 Teste para Verificar a Produção da Acetoína a partir da glicose (Voges-proskauer)

As estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP e incubadas à 28° C por 48 horas. Após a incubação adicionou-se 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, e foram considerados positivos os tubos que estiveram com a coloração vermelha em até 15 minutos (MAC FADDIN, 1976).

4.3.7 Teste da utilização aeróbia dos carboidratos (Maltose e Trealose)

As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização da maltose e trealose (Vetec, Rio de Janeiro), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*.

Estes testes foram realizados em Caldo Vermelho de Fenol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 1% do respectivo carboidrato (o carboidrato foi adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana de diâmetro 0,45µm poro). Foi inoculado o microrganismo 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 microrganismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para amarelo). Prova negativa: multiplicação do microrganismo sem alteração de cor. (MAC FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001).

4.4 Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (UNESP) utilizando o Kit GFX Genomic Blood (Amersham Biosciences) que contém uma solução de lise, solução de extração, solução de lavagem e colunas de GFX de purificação, além de ter sido feito um pré-tratamento com lisozima. Colônias de *S.aureus* foram retiradas com uma alça de sementeira do agar sangue e inoculadas à 37° C por 18 horas, em 1,5 mL caldo cérebro coração (BHI) em tubos tipo ependorfes com volume de 2,0mL.

Os ependorfes contendo as colônias inoculadas no BHI foram centrifugados por 30 segundos a 14.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 40µL de tampão lisozima (agitou-se em vortex até o total desprendimento do pellet). Foi adicionado 10µL de lisozima e agitado em vortex. O tubo ficou 15 minutos em temperatura ambiente, foi então adicionado 10µL de Proteinase K e agitado em vortex. Os tubos foram incubados a 55° C por 15 minutos. Então foram adicionados 5µL

de RNase e agitados, permaneceram 15 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 500µL da solução de extração, agitados e permaneceram 10 minutos em temperatura ambiente sendo agitados ocasionalmente. Toda mistura foi transferida para coluna GFX encaixada em um microtubo. Foram então centrifugadas a 8000rpm por 1 minuto. O líquido do tubo foi descartado e colocou-se novamente 500µL da solução de extração na coluna (Centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto). O líquido foi descartado e depositado no tubo.

Após o procedimento citado acima foi então adicionado 500µL da solução de lavagem na coluna GFX. Centrifugou-se a velocidade máxima de 12 a 16000rpm por 3 minutos. O líquido foi descartado do tubo e transferido a coluna para um novo tubo de 1,5mL. Adicionou-se 200µL de tampão TE pré-aquecido a 70° C na coluna encaixada no novo tubo e deixou-se por 1 minuto em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto. O microtubo coletor foi mantido a -20° C até o momento do uso (BRAOIOS, 2005).

4.5 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. Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em concentração de 2% corado com brometo de etídio. Marcador de tamanho de 100 bp foi utilizado como padrão de peso molecular.

4.6 Caracterização Fenotípica

4.6.1 Teste do Ágar Vermelho Congo

A produção de biofilmes pelas estirpes de *S. aureus* foi determinada 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 Agar 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 pretas foi utilizada para diferenciar de estirpes não produtoras de biofilmes, as quais apresentaram colônias lisas e vermelhas. Foram utilizadas também as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e (ATCC 12228), para fins de controle positivo e negativo respectivamente.

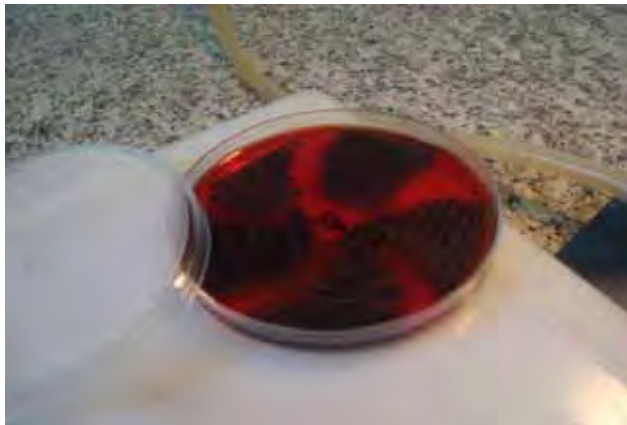


FIG.2: Colônias negras e rugosas no Agar Vermelho Congo, estirpes de *S. aureus* produtoras de *Slime*.

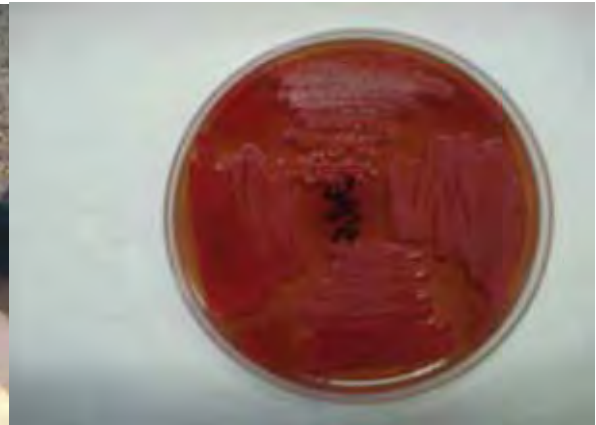


FIG.3: Colônias vermelhas e lisas no Agar Vermelho Congo, estirpes de *S. aureus* não produtoras de *Slime*.

4.6.2 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. 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 incubou-se por 24 horas à 37°C sem agitação. Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) secos à 60° C por 1 hora logo após foram corados com 1% de solução cristal violeta por 1 minuto.

Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 492nm (Thermoplate reader). Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em duplicada e o teste foi repetido 3 vezes, foram consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al, 2000). As cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva).

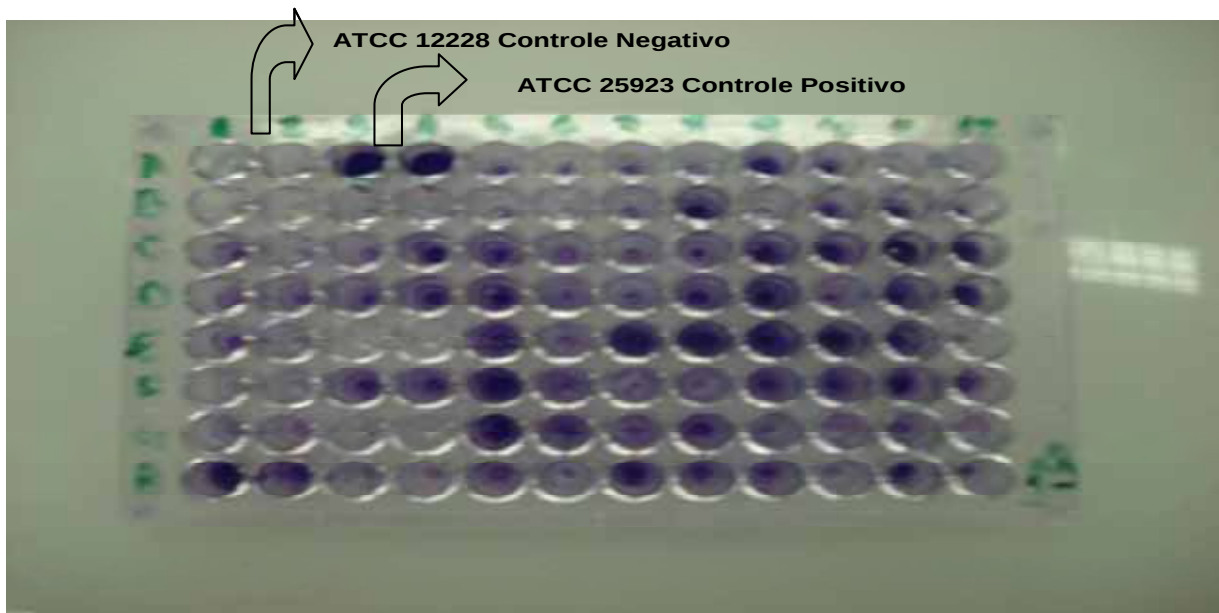


FIG.4: Teste de aderência em microplacas. Poços A1 e A2: **ATCC 12228**, *S. aureus* não produtores de biofilmes. Poços A3 e A4: **ATCC 25923**, *S. aureus* produtores de biofilmes, cepas coradas com Cristal Violeta (1%). Visualização de estirpes positivas (Coloração evidente) e Negativas (Coloração ausente ou Fraca).

4.7 Caracterização Genotípica

4.7.1 Amplificação de DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes *icaA* e *icaD*.

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do *icaA* e *icaD* genes foram descritos do Gen Bank seqüência do *ica* locus (CRAMTON et al, 1999). 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 2% de gel de agarose corado com brometo de etídio. Foi utilizado um marcador de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil). As cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva).

Seqüência do fragmento de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Brasil):

icaA

Forward: 5' – TCTCTTGCAGGAGCAATCAA - 3'

Reverse: 5' - TCAGGCACTAACATCCAGCA - 3'

Tamanho do produto: 188pb

icaD

Forward: 5' – ATGGTCAAGCCCAGACAGAG – 3'

Reverse: 5' – CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA – 3'

Tamanho do produto: 198pb

4.8 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 antimicrobianos para microrganismos gram positivos (Laborclin), os quais consistiam em unidades plásticas às quais estavam aderidos 12 discos de papel com diâmetro de 6 mm, impregnados com princípios ativos para uso em antibiograma por difusão em agar (placas de 140mm de diâmetro), contendo o agar 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 utilizado o ATCC 29213 como controle.

4.9 Análise Estatística

Foi efetuado estudo estatístico, utilizando-se o teste do Qui-quadrado, para avaliar se houve significância entre os testes, o coeficiente de Kappa, que determinou se houve uma boa concordância entre os testes, a porcentagem de sensibilidade e especificidade entre os testes, e o valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). Estes testes foram realizados pelo programa de computador SAS (2002) e pelo programa de computador TestDiag (Cálculos estatísticos básicos para testes diagnósticos) (GODOY et al., 1999) no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal-SP.

Segue-se no quadro abaixo a fórmula utilizada pelo programa TestDiag (GODOY et al., 1999).

	Positivo	Negativo
Positivo	a Verdadeiro Positivo	b Falso Positivo
Negativo	c Falso Negativo	d Verdadeiro Negativo

Sensibilidade: $a / (a + c)$

Especificidade: $d / (b + d)$

VPP: $a / (a + b)$

VPN: $d / (c + d)$

Kappa: $(Po - Pe) / 1 - Pe$

Po: Frequência observada

Pe: Frequência esperada

Resultado Kappa: (<0,20=pobre; 0,21-0,40=fraca; 0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=boa; >0,80=muito boa).

5. RESULTADOS

Foram identificadas 263 estirpes de *S. aureus* pelos testes bioquímicos, sendo que a amplificação do DNA cromossômico para identificação dos *S. aureus* não foi observada em 50 estirpes de *S. aureus*. Para a realização dos estudos fenotípicos e genotípicos utilizados na avaliação da capacidade produtora de biofilmes das estirpes de *S. aureus* investigadas foram testadas 94 estirpes (44%) de 213 estirpes de *S. aureus* positivas na reação de PCR. Não houve nenhum caso clínico de mastite, nos rebanhos estudados, no período da presente pesquisa.

A tabela 1 revela a distribuição das estirpes de *S. aureus* identificadas pelos testes bioquímicos e pela reação de PCR.

Tabela 1 – Distribuição das estirpes de *S. aureus* identificadas por testes bioquímicos e pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas propriedades no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.

Teste Identificação	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>			
	Confirmadas	%	Não confirmadas	%
Bioquímica	263 / (263)	100	0 / (263)	0
PCR	213 / (263)	80,1	50 / (263)	19,9

A tabela 2 evidencia a produção de “slime” no Agar Vermelho Congo (CRA), sendo as estirpes que apresentavam colônias negras 80 (85%) foram consideradas como sendo produtoras de biofilmes e as estirpes que mostravam colônias vermelhas 14 (15%), caracterizadas como não produtoras de biofilmes.

A avaliação quantitativa da produção de “slime” por estirpes de *S. aureus* mostrou que 93 (98,9%) das estirpes se aderiram fortemente, e 1 (1,1%) não aderiu a placa de poliestireno. (Tabela 2).

Os dados da tabela 2 mostram que 90 (95,7%) das estirpes apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, enquanto que 4 (4,3%) das estirpes não apresentaram os genes *icaA* e *icaD*.

Tabela 2 – Resultados do estudo fenotípico e genotípico das estirpes de *S. aureus* para produção de *slime*, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.

Testes Diagnósticos	Estirpes de <i>S. aureus</i>			
	Positivas	%	Negativas	%
Agar Vermelho Congo (CRA)	80 / (94)	85	14 / (94)	15
Teste de Aderência em Microplacas	93 / (94)	98,9	1 / (94)	1,1
Deteção dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	90 / (94)	95,7	4 / (94)	4,3

Tabela 3 – Sensibilidade e Resistência das estirpes de *S. aureus* frente aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite, de vacas com mastite subclínica, em duas propriedades no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.

ANTIMICROBIANOS	Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de amostras de leite			
	Sensíveis	%	Resistentes	%
Cefepime	94 / (94)	100	0 / (94)	0
Ciprofloxacina	94 / (94)	100	0 / (94)	0
Cloranfenicol	93 / (94)	98,9	1 / (94)	1,1
Clindamicina	93 / (94)	98,9	1 / (94)	1,1
Eritromicina	93 / (94)	98,9	1 / (94)	1,1
Gentamicina	92 / (94)	97,8	2 / (94)	2,2
Oxacilina	93 / (94)	98,9	1 / (94)	1,1
Penicilina G	88 / (94)	93,4	6 / (94)	6,6
Rifampicina	94 / (94)	100	0 / (94)	0
Sulfazotrin	94 / (94)	100	0 / (94)	0
Tetraciclina	94 / (94)	100	0 / (94)	0
Vancomicina	94 / (94)	100	0 / (94)	0

Na tabela 3 pôde-se observar a distribuição das estirpes de *S. aureus* sensíveis e resistentes aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina. Verifica-se que ocorreram estirpes resistentes a mais de um princípio ativo sendo que, a maior resistência ocorreu frente à penicilina G 6 (6,6%) e a gentamicina 2 (2,2%). Observa-se também a presença de uma estirpe multi-resistente (resistentes a seis antimicrobianos). Ressalta-se ainda, a presença de uma estirpe resistente ao cloranfenicol, antimicrobiano proibido para uso na produção animal.

Na tabela 4, verifica-se que 75 (79,7%) das estirpes obtiveram as seguintes características: produção de colônias negras, forte aderência, presença dos genes *icaA* e *icaD*, e sensibilidade aos antimicrobianos. Cinco (5,4%) estirpes apresentaram as seguintes características: produção de colônias negras, forte aderência, presença dos genes *icaA* e *icaD*, e resistência aos antimicrobianos. Já para as estirpes que produziram colônias vermelhas, 7 (7,5%) apresentaram características de forte aderência, presença dos genes *icaA* e *icaD* e sensibilidade aos antimicrobianos. Apenas uma estirpe apresentou características de não produção de biofilmes associadas em conjunto. Para as estirpes que produziram colônias vermelhas, 3 (3,1%) não possuíam os genes *icaA* e *icaD* de modo a concordar com este teste, mas não concordaram com o teste de aderência em placas, sendo assim estas estirpes foram consideradas não produtoras de biofilmes devido a ausência dos genes *icaAD*. Três (3,2%) estirpes que produziram colônias vermelhas possuíam ambos os genes, apresentaram aderência no teste de microplacas sendo que 2 (2,1%) foram resistentes aos antimicrobianos e uma (1,1%) foi sensível aos antimicrobianos testados.

Tabela 4 – Distribuição dos resultados das provas fenotípicas e genotípica das estirpes de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite, de vacas com mastite subclínica, em duas propriedades, no estado de São Paulo, no período de 2001 a 2006.

Morfologia no Agar Vermelho Congo	Aderência em placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos	Estirpes de <i>S. aureus</i> Total	%
Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível	75 /(94)	79,7
Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente	5 /(94)	5,4
Vermelha	Fraca aderência	Positivo	Positivo	Sensível	1 /(94)	1,1
Vermelha	Negativa	Negativo	Negativo	Sensível	1 /(94)	1,1
Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível	7 /(94)	7,5
Vermelha	Forte aderência	Negativo	Negativo	Sensível	3 /(94)	3,1
Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente	2 /(94)	2,1
TOTAL	-	-	-	-	94 /(94)	100

Os dados da tabela 5 mostram que a análise estatística entre os testes CRA e da presença dos genes evidenciou significância, porém com uma concordância moderada ($K=0,41$). A sensibilidade, ou seja, a capacidade do teste detectar estirpes positivas foi de 88,9%, enquanto que a especificidade, ou seja, a capacidade do teste detectar estirpes negativas foi de 100%. Isso demonstra que o teste CRA é um teste muito específico, mas de baixa sensibilidade e valor preditivo negativo, o qual foi de 28,6% isso significa que as estirpes verdadeiramente negativas entre as que foram detectadas negativas são de 28,6%.

Verifica-se também que o teste de aderência em microplacas apresentou uma concordância fraca ($K=0,39$) com a presença dos genes *icaA* e *icaD*. Porém, evidenciou-se uma sensibilidade de 100% e VPP de 96,8% e VPN de 100%. Apesar de a especificidade ter sido baixa no valor de 25% esse teste mostrou ser até o momento o melhor teste para o diagnóstico de estirpes produtoras de biofilmes devido a sua alta sensibilidade. As análises também foram estatisticamente significativas ($p<0,05$) (Tabela 5).

Quando comparado com o padrão ouro (presença dos genes) o teste de sensibilidade a antimicrobianos não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). A concordância foi pobre, porém a especificidade do teste foi de 100%. (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados da análise estatística das provas fenotípicas e genotípica das estirpes de *S. aureus*, para a produção de biofilmes, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, em duas propriedades, no estado de São Paulo, no período de 2001 à 2006.

Resultados da Análise Estatística	Testes utilizados para avaliar a produção de Biofilmes por estirpes de <i>S. aureus</i>		
	CRA/Genes <i>icaAD</i>	Aderência Microplacas/ Genes <i>icaAD</i>	Sensibilidade Antimicrobianos Genes <i>icaAD</i>
Kappa	0,41	0,39	0,01
Sensibilidade	88,9%	100%	7,8%
Especificidade	100%	25%	100%
VPP	100%	96,4%	100%
VPN	28,6%	100%	4,6%
p	< 0,05	<0,05	>0,05

Legenda: Valores de Kappa (< 0,20= pobre; 0,21-0,40=fraca; 0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=boa; >0,80= muito boa). p: Significância, (VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo).

Na tabela 6 verifica-se que quando o teste CRA foi comparado com o teste de aderência em microplacas, a concordância avaliada foi pobre ($K=0,12$). A sensibilidade encontrada foi de 86% e a especificidade foi de 100%. As análises estatísticas foram significativas ($p<0,05$). Apesar de ter aumentado a especificidade quando os dois testes foram utilizados juntos, a sensibilidade diminuiu e o VPN foi de 7,1% ou seja, a capacidade de se detectar estirpes verdadeiramente negativas entre as que foram negativas foi baixa, devido ao número encontrado de estirpes falso-negativas.

Tabela 6 – Resultados da análise estatística das provas fenotípicas das estirpes de *S. aureus*, para a produção de biofilmes, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, em duas propriedades, no período de 2001 à 2006.

Resultados da Análise Estatística	Testes utilizados para avaliar a produção de Biofilmes por estirpes de <i>S. aureus</i>
	CRA/ Aderência em microplacas
Kappa	0,12
Sensibilidade	86%
Especificidade	100%
VPP	100%
VPN	7,1%
p	<0,05

Legenda: Valores de Kappa (< 0,20= pobre; 0,21-0,40=fraca; 0,41-0,60=moderada; 0,61-0,80=boa; >0,80= muito boa). p: Significância, (VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo).

6. DISCUSSÃO

6.1 Produção de “Slime” no Agar Vermelho Congo

A análise dos dados inseridos na Tabela 2 mostrou que a produção de biofilmes no Agar Vermelho Congo, com a produção de colônias negras foi de 85% por estirpes de *S. aureus* oriundas de amostras de leite colhidas de casos de mastite subclínica bovina.

VASUDEVAN et al. (2003), estudaram a importância dos biofilmes na mastite e encontraram 91,4% das estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes no agar vermelho congo, valor esse que o presente estudo se aproxima. Foram observados também que algumas estirpes de *S. aureus* produziram colônias negras no período de 48 horas, e após 72 horas de cultivo nenhuma estirpe de *S. aureus* teve capacidade de produzir biofilmes, o que também foi constatado neste estudo. BASELGA et al. (1993), FOX et al. (2005), OLIVEIRA et al. (2006), estudaram a formação de biofilmes em estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite e verificaram a ocorrência de 12%, 41%, e 37,5%, respectivamente, de estirpes produtoras de biofilmes no agar vermelho congo, sendo que no estudo feito por Baselga et al. (1993), não foram avaliadas a presença dos genes *icaA* e *icaD*.

ARCIOLA et al. (2001), identificaram 61% das estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes no agar vermelho congo de infecções associadas a catéteres em humanos.

BERNADI, (2005) estudou a produção de biofilmes em estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de catéteres venosos e encontraram 77,78% das estirpes produtoras de “slime”, sendo que 4 estirpes que foram negativas para produção de biofilmes possuíam os genes *icaA* e *icaD*.

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 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Este meio de cultura permite verificar as modificações fenotípicas das colônias dos *Staphylococcus* coagulase-negativos, 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.

A virulência dos *S. aureus* está associada com sua capacidade de produzir toxinas, fatores extracelulares, adesão e formação de biofilmes nas superfícies dos hospedeiros e ainda resistirem à fagocitose (TAKEUCHI et al, 2001). A capacidade dos *S. aureus* produzirem biofilmes ajuda a bactéria a sobreviver em ambientes hostis dentro do hospedeiro, e esse é um fator responsável por infecções crônicas e ou persistentes (COSTERTON et al., 1999).

Vários estudos mostraram que a formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis* causam infecções associadas a cateteres hospitalares, infecções nosocomiais e os biofilmes estiveram associados à presença dos genes *icaA* e *icaD* (ARCIOLA et al., 2001; BERNADI, 2005). Entretanto, a prevalência dos genes *ica*, e seu papel na formação de biofilmes por *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina ainda não haviam sido investigados no Brasil, isso demonstra a importância dos resultados encontrados no presente estudo associando-se os biofilmes como fatores de virulência na mastite.

6.2 Quantificação da Produção de Biofilmes pelo Teste de Aderência em Placas

A análise da produção de biofilmes pela aderência em placas (Tabela 2) demonstrou que, 98,9% das estirpes se aderiram à placa e foram consideradas produtoras de biofilmes. VASUDEVAN et al. (2003), encontraram 68,57% das estirpes produtoras de biofilmes pela aderência em placas, mas no estudo genotípico 100% das estirpes possuíam os genes *icaA* e *icaD*, mostrando que neste estudo o teste de aderência não apresentou uma boa concordância com teste genotípico.

No presente estudo a porcentagem genotípica foi 95,7% das estirpes de *S. aureus* que possuíam os genes *icaA* e *icaD*. A porcentagem para aderência em placas (fenotípica) foi de 98,9%, demonstrando uma boa correlação entre os resultados do teste genotípico e fenotípico.

FOX et al. (2005), estudaram estirpes de *S. aureus* isoladas de leite, pele do teto, e insufladores e detectaram uma produção de biofilmes “in vitro” em 41%, 24,7% e 14,7% das estirpes isoladas do leite, pele do teto e dos insufladores, respectivamente. Neste estudo não foi correlacionado a produção de biofilme com a presença dos genes *icaAD*.

CRAMTON et al. (1999), AMMENDOLIA, et al. (1999), encontraram 100%, e 88,9%, respectivamente, de produção de biofilmes pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de diferentes infecções humanas, com a presença dos genes *icaA* e *icaD*, e esses valores foram semelhantes ao encontrado neste estudo.

BERNADI, (2005), encontrou 100% das estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativa produtoras de biofilmes quanto à sua aderência em placas e 77% destas estirpes estavam correlacionadas com a presença dos genes *icaAD*.

OLIVEIRA et al. (2006), estudaram a produção de biofilmes por estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* isolados de casos de mastite e encontraram pelo teste de aderência em placas 18,7% de estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes, mas não identificaram a presença dos genes *icaAD* de grande importância para testar a validade do teste.

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 microrganismos.

6.3 Presença dos genes *icaA* e *icaD*

No presente estudo, a presença dos genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela síntese do *slime* foi investigada em 2 cepas de referência ATCC 25923 e ATCC12228 e em 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica. Verificou-se que 95,7% das estirpes de *S. aureus* possuíam os genes *icaA* e *icaD* (Tabela 2).

VASUDEVAN et al. (2003), estudaram estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica e encontraram 100% das estirpes com os genes *icaA* e *icaD*, inclusive as estirpes que apresentaram fase de variação no agar vermelho congo produzindo colônias vermelhas, e concluíram que a presença do *lôcus ica* em todos os *S. aureus* isolados de casos de mastite confirmam o potencial desse gene como fator de virulência na patogenia da mastite de ruminantes.

CRAMTON et al. (1999), ARCIOLA et al. (2001), encontraram 61%, e 100% respectivamente, das estirpes de *S. aureus* estudadas de infecções em humanos, com os genes *icaA* e *icaD*, sendo que o valor encontrado por Arciola et al. (2001) foi aproximado ao encontrado no presente estudo, além disso, os autores citados acima também ressaltaram a importância do gene *ica* como fator de virulência para o *S. aureus*.

BERNADI, (2005), estudou a importância dos biofilmes e sua ligação com o gene *ica* nos *Staphylococcus* coagulase negativa oriundos de cateteres venosos, e encontraram 88,8% das estirpes com gene *icaA* e 92,5% com gene *icaD*, demonstrando também a importância do gene *ica* no estafilococos e sua patogenicidade em infecções clínicas.

MACK et al. (2000), ARCIOLA et al. (2002) demonstraram que a segunda fase da formação dos biofilmes requer a adesina polissacarídica intercelular (PIA), um homopolímero parcialmente desacetilado com resíduo N-acetilglicosamina ligado pela ponte 1-6 beta-glicosídeo, o qual é produzido pelo locus do gene *ica*.

ZIEBUHR et al. (1997), HEILMANN & PETERS (2000) relataram que após a aderência inicial a uma superfície, a bactéria prolifera e acumula-se agrupada em multicamadas. A formação de multicamadas requer a aderência intercelular, realizada por uma adesina polissacarídica intercelular (PIA-polysaccharide intercellular adhesin). De acordo com Mack et al. (1996) PIA representa uma única estrutura polissacarídica.

HEILMANN et al. (1997) relataram que os genes (*icaABC*) que intervêm o agrupamento celular e a síntese do PIA foram clonados e seqüenciados. Mais tarde, o gene *icaD* localizado entre *icaA* e *icaB*, também foi identificado. O gene *icaA* carrega a N-acetilglicosaminatransferase, e sozinha exibe baixa atividade de transferase. A co

expressão de *icaA* junto com *icaD* aumenta a atividade e síntese dos oligômeros N-acetilglicosamina.

ARCIOLA et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do *slime*, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de cepas virulentas formadoras de *slime*.

6.4 Resistência dos *S. aureus* aos antimicrobianos

No presente estudo, avaliou-se a sensibilidade e resistência “in vitro” dos *S. aureus* frente a 12 agentes antimicrobianos segundo a técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966). Foi observado um padrão de resistência envolvendo os seguintes antimicrobianos: cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina e penicilina G. Verificou-se também que uma estirpe (1,1%) foi multi-resistente (resistente a seis antimicrobianos), e seis estirpes (6,6%) foram resistentes aos antimicrobianos citados acima sendo que a maior resistência ocorreu frente à penicilina G (6,6%) e a gentamicina (2,2%). Ressalta-se também a presença de uma estirpe (1,1%) resistente ao cloranfenicol, antimicrobiano proibido para uso na produção animal (Tabela 3).

Apesar da porcentagem de estirpes resistentes aos antimicrobianos na presente pesquisa ter sido baixa, deve-se levar em consideração a presença das mesmas e de uma estirpe multi-resistente. Além do mais, esta técnica avaliou apenas a eficiência do antimicrobiano na célula livre e não nos biofilmes.

Devido à impossibilidade da técnica de difusão em disco avaliar a eficiência dos antimicrobianos nos *S. aureus* em biofilmes, Amorena et al. (1999) estudaram uma técnica que possibilitou avaliarem a sensibilidade e resistência dos antimicrobianos em biofilmes. O estudo envolveu 11 antimicrobianos e 4 estirpes de *S. aureus* produtoras de “slime”. Foi utilizado um ensaio em placas de poliestireno, avaliando 2 etapas dos biofilmes uma com 6 horas de formação (biofilmes jovem), outra com 48 horas de formação (biofilmes velhos). Utilizaram também dois meios de cultivo um com TSB (caldo) e outro com leite. Três concentrações de antimicrobianos foram testadas (4 vezes a concentração do disco; 100mg/L e 500mg/L), A ATP bioluminescência foi

utilizada para determinar a viabilidade das células bacterianas após 24 horas de exposição aos antimicrobianos. Vários antimicrobianos foram viáveis quando se utilizou altas taxas de concentração ($\geq 100\text{mg/L}$) em biofilmes jovens (6 horas de formação).

Maiores taxas de eficiência dos antimicrobianos foram maiores em biofilmes formados no leite que no TSB. Fosfomicina e cefuroxim seguidos da rifampicina, cefazolin, novobiocina, vancomicina, penicilina, ciprofloxacina, e tobramicina afetaram as células dos biofilmes sobre no mínimo uma das condições testadas. Gentamicina e eritromicina não afetaram significativamente as células dos biofilmes, sendo sem efeito sob células dos biofilmes. Sendo que o cefuroxim não é comumente utilizado em tratamento devido ao não conhecimento da sua taxa de toxicidade em muitas espécies.

A ciprofloxacina teve uma menor eficiência nos biofilmes quando comparada com cefalosporina e rifampicina. Muitos estudos mostraram que as quinolonas (ex. ciprofloxacina) tiveram uma alta eficiência considerando que ela atingiu 14 vezes a concentração no soro sanguíneo, sendo esta, uma vantagem para ser utilizada em tratamentos de infecções crônicas em humanos e em mastites em ruminantes (tratamento no período seco, evitando resíduos antimicrobianos no leite), e quando associada à rifampicina apresenta maior sucesso no tratamento.

No trabalho de Amorena et al. (1999), a cefalosporina e rifampicina apresentaram ser bons antimicrobianos para bactérias em biofilmes, e a vancomicina é um potente inibidor da síntese de peptidoglicano, que é mais usada em casos de *S. aureus* multi-resistente (MRSA) (NIETO et al., 1971 citado por AMORENA et al., 1999). A vancomicina foi significativa para matar bactérias em biofilmes, mas em biofilmes (48 horas) na concentração (4 vezes MBC) foi ineficiente. Isso pode ter ocorrido devido à inibição dos efeitos de glicopeptídeos nas matrizes dos biofilmes ou a baixa susceptibilidade das bactérias nos biofilmes. Pode-se utilizar antimicrobianos com efeitos sinérgicos como a rifampicina e a novobiocina. Uma analogia semelhante que foi descrita é a utilização da penicilina com a novobiocina na terapia da mastite (TARDÁGUILA et al., 1997; citado por AMORENA et al., 1999).

BERNADI, (2005), avaliou estirpes hospitalares de *Staphylococcus coagulase* negativa isoladas de cateteres quanto a habilidade da produção de biofilmes sobre

superfícies abióticas (cateter esterilizado), antibiograma e a presença de genes *icaAD*. O antibiograma mostrou que 100% *Staphylococcus* coagulase-negativos eram sensíveis a vancomicina e 88,88% resistentes a penicilina.

FERREIRA, (2004), estudou a variabilidade fenotípica e genotípica de 77 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. As estirpes foram submetidas à PCR-ribotipagem e suas sensibilidades “in vitro” a 12 antimicrobianos. Os resultados obtidos revelaram diferentes padrões de resistência, sendo que a lincomicina foi predominante (24,7%). As 58 (75,3%) das estirpes restantes foram sensíveis aos antimicrobianos testados. Além do que entre as 19 estirpes resistentes aos antimicrobianos, 14 (73,5%) foram agrupadas em 3 padrões de ribotipagem e destas 13 (92,9%) apresentaram resistência a eritromicina e lincomicina, isoladamente ou em associação.

PACHECO et al. (2007), estudaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de 710 estirpes de *S. aureus* isolados de amostras de leite, oriundos de mastite subclínica de diferentes regiões no estado de Minas Gerais, no período de 1997-2006. Foi utilizada a técnica de difusão em disco e no período de 1996-2002, houve uma variação na susceptibilidade do *S. aureus* frente aos antimicrobianos, principalmente aos beta-lactâmicos (penicilina, ampicilina e cloxacilina), os quais apresentaram menores desempenhos durante o período. A enrofloxacin (97,66%), gentamicina (94,66%) e norfloxacin (93,12%) apresentaram-se como os de maior eficiência “in vitro”. A resistência a outros antimicrobianos como a penicilina (75,13%), ampicilina (63,01%), e polimixina-B (59,06%), foi observada durante todo o período.

Outros agentes como, trimetropim-sulfonamidas, foram eficientes durante quase todo período, mas houve uma diminuição no percentual de estirpes susceptíveis entre os anos de 2000 a 2004. Este estudo permitiu monitorar o aparecimento de mutantes resistentes e a baixa eficiência dos tratamentos por mastites causadas por *S. aureus*.

Estudos “in vitro” demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se de 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparado com a célula livre da mesma estirpe (AMORENA et al., 1999; OLSON et al., 2002; CONLEY et al., 2003). Os mecanismos responsáveis pela resistência das

bactérias nos biofilmes aos agentes antimicrobianos são: demora na penetração de agentes antimicrobianos através das matrizes dos biofilmes, taxa de crescimento alterado de organismos nos biofilmes, mudanças fisiológicas com o crescimento dos biofilmes incluindo células persistentes.

Sabendo-se que animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente no rebanho, assim podendo permitir a persistência do *S. aureus* durante todas as fases de lactação (ROBERSON et al., 1998; citado por FERREIRA, 2004), faz-se necessário o tratamento dos animais doentes. A este respeito sabe-se que diferentemente dos casos clínicos que são tratados no momento do diagnóstico, a mastite subclínica tem sido preferencialmente tratada no período seco, ocasião que existe maior probabilidade de sucesso na adoção de medidas terapêuticas (MALLARD et al., 1998); uma das formas de se melhorar as taxas de curas bacteriológicas é estender a duração da terapia (SOL et al., 2000).

Segundo Ferreira (2004), o grande número de ribotipos e padrões de resistência a antimicrobianos observados em apenas uma propriedade demonstraram uma grande heterogeneidade genética em populações naturais de *S. aureus*, o que deve ser levado em conta em programas de controle da mastite bovina.

No presente estudo, a presença de estirpes de *S. aureus* produtoras de biofilmes é mais um fator que deve ser avaliado com cautela, principalmente, quando se refere ao tratamento a fim de se evitar que novas estirpes formem biofilmes e troquem genes de resistência aos antimicrobianos, prevenindo assim infecções persistentes.

6.5. Avaliação do grau de concordância, sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos e negativos entre os testes de diagnóstico.

No presente estudo foi investigado o grau de concordância (coeficiente de Kappa), sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) existentes entre o teste do Agar vermelho congo (morfologia das colônias) e a presença dos genes *icaA* e *icaD*. Encontraram-se os seguintes valores: grau de concordância moderado, com acurácia de 89,4%, sensibilidade: 88,9%,

especificidade: 100%, VPP: 100%, VPN: 28,6%. Estes valores significam que o teste do Agar vermelho congo identificou 100% das estirpes negativas e 28,6% foi a possibilidade das estirpes negativas serem verdadeiramente negativas, e dentre as 88,9% de estirpes positivas a possibilidade de elas serem realmente positivas foi de 100%. A análise estatística para os testes genotípico e fenotípicos foi significativa ($p < 0,05$). Devido ao número de estirpes falso-negativas o valor preditivo negativo foi baixo e isso diminuiu também a sensibilidade, quanto a especificidade verificou-se que este teste é muito específico, porém apresenta um baixo VPN, ou seja a capacidade de se detectar estirpes verdadeiramente negativas é baixo (Tabela 5).

Os mesmos parâmetros citados acima foram analisados para o teste de aderência em placas e a presença dos genes *icaA* e *icaD*. E os seguintes valores foram encontrados: As estirpes positivas detectadas foram 100%, e as estirpes negativas foram 25%; quanto a possibilidade das estirpes positivas serem realmente positivas foi de 96,8%, e a possibilidade das estirpes negativas serem realmente negativas foi de 100%. O grau de concordância encontrado foi fraco, o valor do Kappa foi de 0,39, porém a acurácia foi de 96,8% com kappa variando até 1,07, além deste teste ser muito sensível e apresentar altos valores preditivo positivos e negativos. A análise estatística foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 5).

O teste de aderência em microplacas é o mais indicado para detecção de biofilmes “in vitro”, para as estirpes positivas, sendo então recomendado para análises de rotina em estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite, por apresentar alta sensibilidade, sendo recomendável em testes de diagnóstico utilizar os testes que forem muito sensíveis. Esse teste também apresentou uma melhor correlação com a presença dos genes *icaAD* (padrão ouro), na detecção do polissacarídeo intercelular que é o principal componente do biofilme; este teste também é de fácil realização e permite realizar a análise de 47 estirpes de uma vez o que viabiliza o custo do mesmo.

ARCIOLA et al. (2006), compararam os testes do Agar vermelho congo (CRA) e de aderência em microplacas (MtP) com a presença dos genes *icaA* e *icaD* em estirpes de *Staphylococcus epidermidis* isolados de implantes médicos. E encontraram 57% das estirpes com os genes *icaA* e *icaD*, dessas 3 foram negativas no CRA. Pelo método

MtP verificaram que 66% das estirpes foram produtoras de biofilmes, sendo que dessas 16% positivas foram negativas para a presença dos genes e desses 16%, 10% das estirpes foram classificadas com produtoras fracas de biofilmes (fraca aderência). A melhor concordância com a presença dos genes ocorreu com o teste CRA. Outro fato relatado no trabalho foi que não ocorreu a ausência dos genes expressadas no CRA (fase de variação) o que foi relatado para estirpes de *S. aureus* em outros trabalhos.

Na presente pesquisa o teste que apresentou melhor sensibilidade foi o teste de aderência em microplacas. O teste CRA apresentou muitos resultados falso-negativos, provavelmente devido à fase de variação que já foi relatada em trabalhos com estirpes de *S. aureus* e na presente pesquisa também, diferentemente das estirpes de *S. epidermidis* que em outros trabalhos tiveram bons resultados no CRA.

Outra análise que foi feita na presente pesquisa foi a avaliação dos parâmetros citados acima entre o antibiograma e a presença dos genes *icaA* e *icaD*. Foram encontrados os seguintes resultados: Sensibilidade: 7,8%, Especificidade: 100%, VPP: 100%, VPN: 4,6% e o grau concordância foi pobre, sendo o valor do K: zero e acurácia de 11,7% (Tabela 5). Estes resultados que foram encontrados podem ter sido devido ao teste de antibiograma por difusão em disco não detectar a sensibilidade e resistência dos microrganismos em biofilmes, detectando apenas para a célula bacteriana livre. Este teste foi bom para detectar estirpes verdadeiramente resistentes entre as estirpes resistentes, pois a especificidade e o VPP encontrado foram de 100%. Mas, ao se avaliar as estirpes sensíveis não se pode inferir que, quando as estirpes estiverem agrupadas em biofilmes elas vão apresentar esse mesmo padrão de sensibilidade.

Todos os testes, com exceção do antibiograma, foram estatisticamente significantes com o valor de $p < 0,05$. Não foi encontrado nenhum trabalho de pesquisa que avaliou os parâmetros discutidos acima, ressaltando-se assim a importância de avaliar tais parâmetros quando se compara métodos de diagnóstico, o que possibilita uma maior credibilidade nos mesmos.

Os dados inseridos na Tabela 6 revelaram que quando os testes fenotípicos (CRA e teste de aderência em microplacas) foram testados quanto a sensibilidade, especificidade, concordância e significância, foram encontrados os seguintes

resultados: A sensibilidade foi de 86%, e a especificidade foi de 100%, mas a concordância entre os testes foi pobre e com acurácia de 86%. Esta comparação entre os dois testes demonstrou que não é necessária a utilização dos dois testes fenotípicos para o diagnóstico, pois apesar de aumentar a especificidade em relação ao teste de aderência em microplacas, o valor preditivo negativo que foi de 7,1% ou seja, a capacidade de detecção de estirpes verdadeiramente negativas entre as negativas foi baixa.

A utilização dos dois testes poderia aumentar o custo do diagnóstico, sendo que o teste de aderência em microplacas quando utilizado sozinho apresentou uma boa sensibilidade, já quando os dois testes foram utilizados juntos a sensibilidade diminuiu. O valor de ($p < 0,05$), mostrou que a análise foi estatisticamente significativa.

7. CONCLUSÕES

Confirmou-se pela técnica de PCR a presença de 213 (80,10%) estirpes de *S. aureus* de um total de 263 estirpes identificadas pelos testes bioquímicos.

Na avaliação da produção de *slime* por estirpes de *S. aureus* em Agar vermelho congo verificou-se a presença de estirpes produtoras de *slime* que foi de 85%.

A avaliação quantitativa da produção de biofilmes realizada pelo teste de aderência em microplacas evidenciou que 98,9% das estirpes de *S. aureus* se aderiram às placas de poliestireno.

O estudo genotípico verificou a presença dos genes *icaA* e *icaD*, em 95,15% das estirpes de *S. aureus* estudadas.

Observou-se um padrão de resistência envolvendo os seguintes antimicrobianos: cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina e penicilina G, sendo que a maior resistência ocorreu frente à penicilina G e a gentamicina.

O teste de aderência em microplacas foi o que apresentou a maior sensibilidade (100%) e VPP (96,4%) e VPN (100%) para a detecção da produção de biofilmes quando comparado com a presença dos genes *icaA* e *icaD*.

O teste do Agar Vermelho Congo (CRA) foi o que apresentou maior especificidade (100%) quando comparado com a presença dos genes *icaA* e *icaD*.

O Kappa para o teste de aderência em placas foi fraco e para o teste CRA foi moderado.

É desnecessária a utilização simultânea de ambos os testes fenotípicos na detecção de estirpes produtoras de biofilmes, pois quando os testes de aderência em microplacas e CRA foram comparados em conjunto a sensibilidade foi de 86%, a especificidade foi de 100%, o VPP foi de 100% mas o VPN foi de 7,1% e a concordância foi pobre.

A grande maioria dos isolados de *S. aureus* do leite bovino oriundos de quartos com mastite subclínica foi capaz de produzir biofilmes e apresentaram os genes *icaA* e *icaD*.

Considerando a presença dos genes *icaA* e *icaD* como fundamentais para a produção de biofilmes e o teste de aderência em placas por apresentar alta sensibilidade e alto valor preditivo positivo é o teste mais indicado para verificar a capacidade de produção de biofilmes de isolados de *S. aureus* do leite bovino oriundos de quartos com mastite bovina.

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se a capacidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* formarem biofilmes e aderirem a diversas superfícies, principalmente de equipamentos e instalações no ambiente de ordenha ressalta-se a importância da sanitização e higiene adequada destes equipamentos para a eliminação desses agentes.

Sabendo-se que o processo de infecção da glândula mamária por estirpes de *S. aureus* ocorre via ascendente pelo canal do teto e tendo em vista a capacidade dos mesmos se aderir e formarem biofilmes permanecendo nos alvéolos evidencia-se a importância do pré e pós-dipping na profilaxia da mastite.

O manejo profilático é o caminho adequado para prevenir a infecção e evitar a formação de biofilmes e consequentemente à alta resistência dos microrganismos, já que essa resistência dificulta o tratamento das mastites e pode aumentar os casos de infecções subclínicas.

Sendo assim justifica-se a importância de novos estudos para o conhecimento dos agentes formadores de biofilmes e seus mecanismos de adesão de forma a fornecer subsídios para a profilaxia da mastite bovina.

8. REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, A. C.; MENDES, C.P.A.; SILVA, D. B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Revista Higiene Alimentar**., v.19, n.134. Agosto, 2005.

ALMEIDA, R. A.; FANG, W.; OLIVER, S. P. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. **FEMS. Microbiology Letters**., v.177, p.313-317, 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Fourth edition, Washington, 2001. 676p.

AMMENDOLIA, M.G.; DI ROSA, R.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 37, p. 3235-3238, 1999.

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

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M.J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v.44, p. 1818-1824, 2000.

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.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.

ARCIOLA, C. R. et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR – method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. **Journal of Biomedical Material Research**, v.76, p.425-430, 2006.

BALDASSARI, L. et al. Purification and characterization of the staphylococcal slime associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 3410-3415, 1996.

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.

BARRIO, B. et al. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Veterinary Research**, v.31, p. 603-609, 2000.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**., v. 61, p. 4857-4862., 1993.

BASELGA, R. e ALBIZU, I. **Exopolisacarídeos capsulares bacterianos**, 2004. Disponível em: <www.exopol.com/exo> Acesso em: 15. Fev. 2006.

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

BERNADI, A.C.A. **Estudo de Amostras de *Staphylococcus coagulase-negativos* Quanto a Formação de Biofilme**. Tese (Doutorado em Análises Clínicas – Microbiologia clínica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, Araraquara-Sp, 2005.

BEECH, W.B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, n.3, p181-186, June 2004.

BRAOIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas**. Tese. (Doutorado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Campus de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

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.

CAFISO, V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbial Infection.**, v. 10, p. 1081-1088, 2004.

CHRISTENSEN, B.E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **Journal of Biotechnology.**, v. 10, p. 181-202, 1989.

CIFRIAN, E. et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. **Journal Dairy Science.**, v.77, p. 970-983, 1994.

CLUTTERBUCK, A.L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Review. Veterinary Microbiology.**, v.121, p.1–17, 2007.

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.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Bacteriology.**, v. 184, p. 4400-4408, 2002.

CONLON, K.M.; HUMPHREYS, H.; O' GARA, J.P. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v.186, p. 6208-6219, 2004.

COSTA, E. O. et al. Portador: Um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. **Revista Napgama**., v.8, n.1, 2005.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. 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.

DALTON, H.M.; MARCH, P. E. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. **Current Opinion in Biotechnology**., London, v.9, n.3, p. 252-255, June 1998.

DELUYKER, H. A.; CHESTER, S.T.; VAN OYE, S. N. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincomycin/neomycin combination with a ampicillin/cloxacillin combination. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.**, V.22, p.274-282, 1999.

DINGES, M. M.; ORWIN, P.M.; SCHLIERVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews.**, Washington, v.13, n.1, p16-34, Jan 2000.

DOBINSKY, S.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Influence of Tn917 insertion of transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. **Plasmid.**, v. 47, p. 10-17, 2002.

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.

DU PREEZ, J.H. Bovine Mastitis therapy and why it fails. **Journal of South African Veterinary Association.**, v.71, p.201-208, 2000.

ERSKINE, R.J. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science.**, v.85, p.1111-1118, 2002.

EUZÉBY (J.P.): List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. **International Journal Systematic Bacterial.**, v.47, p.590-592, 1997. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Last full update March 02/2007. Disponível em: URL: <http://www.bacterio.net>, Acessado em: 10/03/2007.

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.

FARBER, B.F.; KAPLAN, M.H.; CLOGSTON, A.G. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. **Journal Infection Disease.**, v. 40, p. 37-40, 1990.

FERREIRA, L. M. **Variabilidade fenotípica e genotípica das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2004.

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.

FITZGERALD, R.H.; RICHARDSON, J.F.; SANE, M.J. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase negative staphylococci. **Zentralbakteriologie Supply.**, v. 14, p. 463-469, 2005.

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

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.

GALDBART, J.O. et al. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. **Journal Infection Disease.**, v. 5, p. 351-355, 2000.

GARRITY, G. M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Boone, DR, Castenholz, RW (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.**, New York: Berlim: Springer-Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

GERKE, C. et al. Characterization of the N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesin. **Journal Biology Chemotherapy.**, v. 273, p.18586-18596, 1998.

GODOY, M.F.; BRAILE, D.M. **Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos**,1999. Disponível em: <http://www.braile.com.br/DOWNLOAD/TestDiag.xls>, Acessado em 10 Agosto, 2007.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology.**, v.43, p.1367–1378, 2002.

HANDKE, L.D. et al. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. **Journal Medical Microbiology**., v. 53, p. 367-374, 2004.

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

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETES, G.; GÖTZ, F. Evidence for autolysin mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**., v. 24 , p. 1013-1024, 1997.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Gram-positive pathogens**., 1. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. Cap. 46, p.442-449.

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.

HILLERTON, J. E.; KLIEM, K. E. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. **Journal of Dairy Science**., v.85, p.1009-1014, 2002.

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.

HOUBEN, E. H. et al. Short-and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science.**, v.76, p. 2561-2578, 1993.

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

JOHANNES, K. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal Bacteriology.**, v. 183, p.2624-2633, 2001.

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.

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.

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.

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.

MALLARD, B. A. et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **Journal of Dairy Science**., Champaign, v.81, n.2, p.585-595, 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 absorption 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.

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

MENDONÇA, C.L. et al. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**., Uberlândia, v.5, n.1, p.107-118, 1999.

MONZON, M. et al. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v.48, p.793-801, 2001.

MONZON, et al. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**, v.44, p.319-324, 2002.

MORALES, M. et al. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. **Support care cancer.**, v. 12, p. 701-707, 2004.

MORTON, L. H. G. et al. Considerations of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation.**, Oxford, v.41, n.3/4. P.247, 1998.

MOTA, R. A. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. **Revista Napgama.**, São Paulo. v.7, p.10-13, 2004.

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.

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

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

OWENS, W.F. et al. Prevalence mastitis in dairy heifers and effectiveness of antibiotic therapy. **Journal of Dairy Science.**, v.84, p.814-817, 2001.

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

PACHECO, J. T. et al. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de mamite bovina em Minas Gerais, durante o período de 1997-2006. **Anais do IV Encontro de Pesquisadores em Mastites**, p.94, Botucatu-SP, Junho, 2007.

PEREIRA, U. P. et al. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do sul de Minas Gerais. **Anais do IV Encontro de Pesquisadores em Mastites**, p.92, Botucatu. Junho, 2007.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology.**, London, v.17, n.4, p.361-365. Aug. 2000.

PYORALA, S.H.; PYORALA. E. O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). **Journal of American Veterinary Medical Association.**, v.212, p.407-412, 1998.

RACHID, S. et al. Alternative transcription factor σ_B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. **Journal Bacteriology.**, v.182, p.6824–6826, 2000.

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.

ROSSITTO, P. V. et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. **Journal of Dairy Science.**, v.85, p132-138, 2002.

SAS/STAT. User's Guide, 2002. Release 8.1. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

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.

SHEPHARD, R.W.; MALMO, J.; PFEIFFER, D.U. A clinical trial to evaluate the effectiveness of antibiotic treatment of lactating cows with high somatic cell counts in their milk. **Australian Veterinary Journal** v.78, p.763-768, 2000.

SHOSHANI, E. et al. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. **Journal of Dairy Research**., v.67, p.155-169, 2000.

SOL, J. et al. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**., v.83, p. 278-284, 2000.

SORDELLI, D. O. et al. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiology analyses. **Journal Clinical Microbiology**., v.38, p.846-850, 2000.

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

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**., London, v.9, n.5, p.222-227, May 2001.

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.

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

TOLLERSRUD, T. et al. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. From Europe and the United States. **Journal Clinical Microbiology**., v.38, n.8, p.2998-3003, 2000.

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.

VUONG, C. et al. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal Infection Disease**., v.182, p.1688–1693, 2000.

WILSON, D.J. et al. Comparision of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**., v.82, p.1664-1670, 1999.

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.

YANCEY, R.J.; SANCHEZ, M.S.; FORD, C.W. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. **European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases.**, v.10, p.107-113, 1991.

YASUDA, H. et al. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilms models. **Journal of Medical Microbiology.**, v.41, p. 359-367, 1994.

ZHANG, X.; BISHOP, P.L.; KUPFERLE, M.J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. **Water Science Technology.**, v. 37, p. 345-348, 1998.

ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GOTZ, F.; MEYER, P.; WIMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strain and mucosal isolates. **Infection and Immunity.**, v. 65, p. 890-896, 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.

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.

APÊNDICE

Tabela 2.1 – Produção de *slime* no Agar Vermelho Congo, entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, na propriedade A, no período de 2001 a 2002, município de Colina-Sp.

Variação da cor em Agar Vermelho Congo em estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Estirpes	Negra (produtora de <i>slime</i>) Positivas.	Vermelha (não produtora de <i>slime</i>) Negativas.
ATCC 12228		
Controle negativo	-	vermelha
ATCC 25923		
Controle positivo	negra	-
11	negra	-
14	negra	-
17	-	vermelha
19	negra	-
54	negra	-
57	negra	-
58	negra	-
60	negra	-
65	negra	-
70	negra	-
74	negra	-
75	-	vermelha
79	-	vermelha
80	negra	-
86	negra	-
87	-	vermelha
94	negra	-
97	negra	-
98	negra	-
101	negra	-
106	negra	-
113	negra	-
114	negra	-

 Variação da cor em Agar Vermelho Congo em estirpes de *Staphylococcus aureus*

Estirpes	Negra (produtora de <i>slime</i>) Positivas.	Vermelha (não produtora de <i>slime</i>) Negativas.
129		vermelha
130		vermelha
131	negra	-
135	negra	-
137	negra	-
139	negra	-
143	negra	-
144	negra	-
145	negra	-
148	negra	-
152	negra	-
153	negra	-
157	negra	-
158	negra	-
159	negra	-
160	negra	-
162	negra	-
165	negra	-
169	negra	-
171	negra	-
172	negra	-
173	negra	-
176	negra	-
177	negra	-
182	negra	-
183	negra	-
184	negra	-
185	negra	-
186	-	vermelha
188	-	vermelha
189	negra	-
192	negra	-
192	negra	-
194	negra	-

Variação da cor em Agar Vermelho Congo em estirpes de *Staphylococcus aureus*

Estirpes	Negra (produtora de <i>slime</i>) Positivas.	Vermelha (não produtora de <i>slime</i>) Negativas.
197	negra	-
198	negra	-
199	negra	-
200	negra	-
201	negra	-
205	negra	-
TOTAL	55	8
%	87,30	12,7

Tabela 2.2 – Produção de *slime* no Agar Vermelho Congo, entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, na propriedade B, no período de 2005 a 2006, município de Nova Odessa - SP.

Variação da cor em Agar Vermelho Congo em estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Estirpes	Negra (produtora de <i>slime</i>) Positivas.	Vermelha (não produtora de <i>slime</i>) Negativas.
ATCC 12228		
Controle negativo	-	vermelha
ATCC 25923		
Controle positivo	negra	-
208	negra	-
209	-	vermelha
210	negra	-
211	-	vermelha
213	-	vermelha
215	negra	-
217	negra	-
219	negra	-
220	negra	-
221	negra	-
222	negra	-
223	negra	-
224	negra	-
225	negra	-
226	negra	-
227	negra	-
228	negra	-
230	negra	-
231	negra	-
234	negra	-
237	-	vermelha
238	-	vermelha
240	-	vermelha
241	negra	-

Variação da cor em Agar Vermelho Congo em estirpes de *Staphylococcus aureus*

Estirpes	Negra (produtora de <i>slime</i>) Positivas.	Vermelha (não produtora de <i>slime</i>) Negativas.
259	negra	-
260	negra	-
261	negra	-
262	negra	-
263	negra	-
264	negra	-
265	negra	-
TOTAL	25	6
%	80,6	19,4

Tabela 2.3 - Densidade óptica das reações de aderência entre as estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica na propriedade A, no período de 2001 a 2002, município de Colina-Sp.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Densidade óptica do teste de aderência em placas de poliestireno (492nm)		
	Fracamente aderente (0,120 a 0,240nm)	Fortemente aderente ($\geq 0,240$ nm)	Negativas ($\leq 0,1$ nm)
ATCC 12228	-	-	0,031
ATCC 25923	-	2,31	-
11	-	1,16	-
14	-	0,69	-
17	0,23	-	-
19	-	0,37	-
54	-	0,66	-
57	-	0,87	-
58	-	0,63	-
60	-	0,63	-
65	-	0,50	-
70	-	0,71	-
74	-	0,64	-
75	-	-	0,052
79	-	0,274	-
80	-	0,44	-
86	-	0,84	-
87	-	1,6	-
94	-	0,45	-
97	-	0,37	-
98	-	0,56	-
101	-	0,67	-
106	-	0,38	-
113	-	0,75	-
114	-	0,76	-
129	-	0,60	-
130	-	0,30	-
131	-	0,72	-
135	-	0,54	-
137	-	0,62	-
139	-	0,65	-
143	-	0,92	-
144	-	0,50	-
145	-	1,0	-
148	-	0,79	-
152	-	0,54	-
153	-	0,63	-
157	-	0,43	-
158	-	0,69	-
159	-	0,83	-
160	-	0,64	-

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Densidade óptica do teste de aderência em placas de poliestireno (492nm)		
	Fracamente aderente (0,120 a 0,240nm)	Fortemente aderente ($\geq 0,240\text{nm}$)	Negativas ($\leq 0,1\text{nm}$)
162	-	0,67	-
165	-	0,73	-
169	-	0,69	-
171	-	0,37	-
172	-	0,56	-
173	-	0,60	-
176	-	1,14	-
177	-	0,89	-
182	-	1,17	-
183	-	1,39	-
184	-	1,38	-
185	-	0,60	-
186	-	0,60	-
188	-	0,50	-
189	-	0,81	-
192	-	0,83	-
193	-	1,20	-
194	-	0,71	-
197	-	1,16	-
198	-	1,22	-
199	-	1,35	-
200	-	1,15	-
201	-	1,26	-
205	-	1,18	-
TOTAL	1	61	1
%	1,6	96,8	1,6

Tabela 2.4 - Densidade óptica das reações de aderência entre as estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica na propriedade B, no período de 2005 a 2006, município de Nova Odessa - SP.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Densidade óptica do teste de aderência em placas de poliestireno (492nm)		
	Fracamente aderente (0,120 a 0,240nm)	Fortemente aderente (>= 0,240nm)	Negativas (<=0,1nm)
ATCC 12228	-	-	0,031
ATCC 25923	-	2,31	-
208	-	0,84	-
209	-	0,32	-
210	-	0,48	-
211	-	2,11	-
213	-	1,43	-
215	-	1,38	-
217	-	0,79	-
219	-	1,37	-
220	-	0,71	-
221	-	0,90	-
222	-	1,61	-
223	-	0,61	-
224	-	0,71	-
225	-	1,09	-
226	-	2,15	-
227	-	1,08	-
228	-	1,12	-
230	-	2,08	-
231	-	1,13	-
234	-	1,66	-
237	-	1,97	-
238	-	0,49	-
240	-	0,54	-
241	-	1,40	-
259	-	1,21	-
260	-	1,15	-
261	-	1,38	-
262	-	1,0	-
263	-	0,97	-
264	-	1,56	-
265	-	1,58	-
TOTAL	0	31	0
%	0	100	0

Tabela 2.5 - Presença dos genes *icaA* e *icaD* entres as estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica na propriedade A, no período de 2001 a 2002, município de Colina –Sp.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Presença dos genes de virulência	
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
ATCC 12228	NEGATIVO	NEGATIVO
ATCC 25923	POSITIVO	POSITIVO
11	POSITIVO	POSITIVO
14	POSITIVO	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO
19	POSITIVO	POSITIVO
54	POSITIVO	POSITIVO
57	POSITIVO	POSITIVO
58	POSITIVO	POSITIVO
60	POSITIVO	POSITIVO
65	POSITIVO	POSITIVO
70	POSITIVO	POSITIVO
74	POSITIVO	POSITIVO
75	NEGATIVO	NEGATIVO
79	POSITIVO	POSITIVO
80	POSITIVO	POSITIVO
86	POSITIVO	POSITIVO
87	NEGATIVO	NEGATIVO
94	POSITIVO	POSITIVO
97	POSITIVO	POSITIVO
98	POSITIVO	POSITIVO
101	POSITIVO	POSITIVO
106	POSITIVO	POSITIVO
113	POSITIVO	POSITIVO
114	POSITIVO	POSITIVO
129	POSITIVO	POSITIVO
130	POSITIVO	POSITIVO
131	POSITIVO	POSITIVO
135	POSITIVO	POSITIVO
137	POSITIVO	POSITIVO
139	POSITIVO	POSITIVO
143	POSITIVO	POSITIVO
144	POSITIVO	POSITIVO
145	POSITIVO	POSITIVO
148	POSITIVO	POSITIVO
152	POSITIVO	POSITIVO
153	POSITIVO	POSITIVO
157	POSITIVO	POSITIVO
158	POSITIVO	POSITIVO
159	POSITIVO	POSITIVO
160	POSITIVO	POSITIVO
162	POSITIVO	POSITIVO
165	POSITIVO	POSITIVO
169	POSITIVO	POSITIVO
171	POSITIVO	POSITIVO

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Presença dos genes de virulência	
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
172	POSITIVO	POSITIVO
173	POSITIVO	POSITIVO
176	POSITIVO	POSITIVO
177	POSITIVO	POSITIVO
182	POSITIVO	POSITIVO
183	POSITIVO	POSITIVO
184	POSITIVO	POSITIVO
185	POSITIVO	POSITIVO
186	POSITIVO	POSITIVO
188	POSITIVO	POSITIVO
189	POSITIVO	POSITIVO
192	POSITIVO	POSITIVO
193	POSITIVO	POSITIVO
194	POSITIVO	POSITIVO
197	POSITIVO	POSITIVO
198	POSITIVO	POSITIVO
199	POSITIVO	POSITIVO
200	POSITIVO	POSITIVO
201	POSITIVO	POSITIVO
205	POSITIVO	POSITIVO
TOTAL Positivos	61	61
%	96,8	96,8

Tabela 2.6 - Presença dos genes *icaA* e *icaD* entres as estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica na propriedade B, no período de 2005 a 2006, município de Nova Odessa - SP.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Presença dos genes de virulência	
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
ATCC 12228	NEGATIVO	NEGATIVO
ATCC 25923	POSITIVO	POSITIVO
208	POSITIVO	POSITIVO
209	POSITIVO	POSITIVO
210	POSITIVO	POSITIVO
211	NEGATIVO	NEGATIVO
213	POSITIVO	POSITIVO
215	POSITIVO	POSITIVO
217	POSITIVO	POSITIVO
219	POSITIVO	POSITIVO
220	POSITIVO	POSITIVO
221	POSITIVO	POSITIVO
222	POSITIVO	POSITIVO
223	POSITIVO	POSITIVO
224	POSITIVO	POSITIVO
225	POSITIVO	POSITIVO
226	POSITIVO	POSITIVO
227	POSITIVO	POSITIVO
228	POSITIVO	POSITIVO
230	POSITIVO	POSITIVO
231	POSITIVO	POSITIVO
234	POSITIVO	POSITIVO
237	POSITIVO	POSITIVO
238	POSITIVO	POSITIVO
240	NEGATIVO	NEGATIVO
241	POSITIVO	POSITIVO
259	POSITIVO	POSITIVO
260	POSITIVO	POSITIVO
261	POSITIVO	POSITIVO
262	POSITIVO	POSITIVO
263	POSITIVO	POSITIVO
264	POSITIVO	POSITIVO
265	POSITIVO	POSITIVO
TOTAL Positivos	29	29
%	93,5	93,5

Tabela 3.1 - Sensibilidade e Resistência de estirpes de *S. aureus* frente aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos, com mastite subclínica, na propriedade A no período de 2001 a 2002, município de Colina-Sp.

ESTIRPES	ANTIMICROBIANOS											
	CPM	CIP	CLO	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	RIF	SUT	TET	VAN
11	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
14	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	RES	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
17	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
19	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
54	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
57	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
58	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
60	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
65	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
70	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
74	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
75	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
79	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
80	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
86	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
87	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
94	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
97	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
98	SENS	INT	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
101	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
106	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
113	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
114	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
129	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
130	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
131	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
135	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
137	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
139	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
143	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
144	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
145	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	INT	SEN	SEN
148	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN

ANTIMICROBIANOS

ESTIRPES	CPM	CIP	CLO	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	RIF	SUT	TET	VAN
152	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
153	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
157	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
158	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
159	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
160	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
162	SENS	SENS	SENS	INT	INT	INT	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
165	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
169	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
171	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
172	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
173	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
176	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
177	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
182	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
183	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
184	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
185	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
186	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
188	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
189	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
192	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
193	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
194	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
197	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
198	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
199	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
200	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
201	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
205	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
ATCC 25	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
ATCC 12	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	INT	SEN	SEN

Legenda: CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; CLI: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; RIF: Rifampicina; SUT: Sulfazotrin; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina. SENS: Sensível; INT: Intermediário; RES: Resistente.

Tabela 3.2 - Sensibilidade e Resistência de estirpes de *S. aureus* frente aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos, com mastite subclínica, na propriedade B no período de 2005 a 2006, município de Nova Odessa - SP.

ESTIRPES	ANTIMICROBIANOS											
	CPM	CIP	CLO	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	RIF	SUT	TET	VAN
208	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
209	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
210	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
211	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
213	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
215	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	RES	SEN	SEN	SEN	SEN
217	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	RES	SEN	SEN	SEN	SEN
219	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	RES	SEN	SEN	SEN	SEN
220	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
221	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
222	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
223	SENS	INT	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
224	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
225	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
226	SENS	SENS	RES	RES	RES	RES	RES	RES	SEN	SEN	SEN	SEN
227	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
228	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
230	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
231	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
234	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
237	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	RES	SEN	SEN	INT	SEN
238	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	RES	SEN	SEN	INT	SEN
240	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
241	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
259	SENS	SENS	SENS	INT	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
260	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
261	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
262	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
263	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
264	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	INT	SEN
265	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
ATCC 25	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN	SEN
ATCC12	SENS	SENS	SENS	SENS	INT	SENS	SEN	SEN	SEN	INT	SEN	SEN

Legenda: CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; CLI: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; RIF: Rifampicina; SUT: Sulfazotrin; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina. SENS: Sensível; INT: Intermediário; RES: Resistente.

Tabela 4.1 - Distribuição entre os resultados obtidos após estudo fenotípico e genotípico das estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, na propriedade A no período de 2001 a 2002, município de Colina – Sp.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
ATCC 12228	Vermelho	Negativa	Negativo	Negativo	Sensível
ATCC 25923	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
11	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
14	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente
17	Vermelho	Fraca aderência	Positivo	Positivo	Sensível
19	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
54	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
57	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
58	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
60	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
65	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
70	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
74	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
75	Vermelho	Negativo	Negativo	Negativo	Sensível
79	Vermelho	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
80	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
86	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
87	Vermelho	Forte aderência	Negativo	Negativo	Sensível

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
94	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
97	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
98	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
101	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
106	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
113	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
114	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
129	Vermelho	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
130	Vermelho	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
131	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
135	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
137	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
139	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
143	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
144	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
145	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
148	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
152	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
153	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
157	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
158	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
159	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
160	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
162	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
165	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
169	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
171	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
172	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
173	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
176	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
177	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
182	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
183	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
184	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
185	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
186	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
188	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
189	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
192	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
193	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
194	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
197	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
198	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
199	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
200	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
201	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
205	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
Total Estirpes Produtoras de Biofilme	55 (63)	62 (63)	61 (63)	61 (63)	-
%	87,30	98,4	96,8	96,8	-

Tabela 4.2 - Distribuição entre os resultados obtidos após estudo fenotípico e genotípico das estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica, na propriedade B no período de 2005 a 2006, município de Nova Odessa – Sp

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
208	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
209	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
210	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
211	Vermelha	Forte aderência	Negativo	Negativo	Sensível
213	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
215	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente
217	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente
219	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente
220	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
221	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
222	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
223	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
224	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
225	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
226	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente * (6)
227	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
228	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
230	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
231	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
234	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
237	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste do Agar Vermelho Congo	Teste de Aderência em Placas	Presença do gene <i>icaA</i>	Presença do gene <i>icaD</i>	Antimicrobianos
238	Vermelha	Forte aderência	Positivo	Positivo	Resistente
240	Vermelha	Forte aderência	Negativo	Negativo	Sensível
241	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
259	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
260	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
261	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
262	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
263	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
264	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
265	Negra	Forte aderência	Positivo	Positivo	Sensível
Total Estirpes Produtoras de Biofilme	25 (31)	31 (31)	29 (31)	29 (31)	-
%	80,64	100	93,5	93,5	-

***Resistente a seis antimicrobianos: estirpe multi-resistente.**

Tabela 5.1 – Análise estatística entre a presença dos genes *icaA* e *icaD* e a morfologia no Agar Vermelho Congo das estirpes de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (padrão ouro)			
	Positivo	Negativo	Total	%
Morfologia do Agar Vermelho Congo (CRA)				
Positivo	80	0	80	85,10
Negativo	10	4	14	14,90
Total	90	4	94	100

Tabela 5.2 – Análise estatística entre a presença dos genes *icaA* e *icaD* e o teste de aderência em placas das estirpes de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (padrão ouro)			
	Positivo	Negativo	Total	%
Teste de aderência em microplacas (492nm)				
Positivo	90	3	93	98,9
Negativo	0	1	1	1,1
Total	90	4	94	100

Tabela 5.3 – Análise estatística entre a presença dos genes *icaA* e *icaD* e o teste de sensibilidade das estirpes de *S. aureus* frente aos antimicrobianos, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> (padrão ouro)			
	Positivo	Negativo	Total	%
Teste sensibilidade aos antimicrobianos				
Positivo (resistentes)	7	0	7	7,4
Negativo (sensíveis)	83	4	87	92,6
Total	90	4	94	100

Tabela 6.1 - Análise estatística entre o teste de aderência em microplacas e a morfologia do agar vermelho congo das estirpes de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite, oriundas de casos de mastite subclínica bovina, no período de 2001 a 2006.

Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	Teste de aderência em microplacas (492nm) (padrão ouro)			
Morfologia no agar vermelho congo (CRA)	Positivo	Negativo	Total	%
Positivo	80	0	80	85,1
Negativo	13	1	14	14,9
Total	93	1	94	100

Composição do Kit GFX Genomic Blood (Amersham Biosciences) para extração de DNA bacteriano.

COMPOSIÇÃO DO KIT GFX GENOMIC BLOOD (*Amersham Biosciences*)

- Solução de Lise: 10Mm KHCO_3 ; 155mM HH_4CL ; 0,1mM EDTA
- Solução de Extração: tampão contendo agente caotrópico e detergente.
- Solução de Lavagem: Tampão Tris-EDTA.
- Colunas GFX: Colunas MicroSpinTM contendo uma matriz de fibra de vidro.
- Tubos: microtubos com capacidade para 2mL

REAGENTES NÃO FORNECIDOS PELO KIT:

- RNase A (Invitrogen): 20mg/mL
- Tampão TE: 10mM Tris-HCl 1mM EDTA, pH 8.0
- Lisozima (Invitrogen): 10mg/mL em 10mM Tris-HCl, pH 8.0
- Tampão Lisozima: 0,1 M NaCl 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 5% Triton X-100.
- Proteinase K: (Invitrogen): 20mg/mL em 10mM Tris-HCl pH 8.0

Preparo do Agar Vermelho Congo

Ágar Vermelho Congo (Freeman *et al.*, 1989):

Ágar de cerebro-coração-BHI (Biolab).....	37,0g
Sacarose (Sigma).....	50,0g
Corante vermelho Congo (Sigma).....	0,8g
Água destilada.....	1000,0mL
pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C	

Ao meio esterilizado e resfriado a 55°C foi acrescentando assepticamente solução aquosa do corante vermelho Congo e sacarose.

Preparo da Solução de Tampão Fosfato Salina (PBS), pH 7,4:

NaCl.....	8g
KCl.....	0,20g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	2.89g
KH ₂ PO ₄	0,20g
Água destilada.....	1Litro

Os ingredientes citados acima foram dissolvidos na água destilada, logo então o pH foi medido para verificar se estava no grau correto, depois o meio foi autoclavado a 121° C por 15 minutos e assim foi mantido a temperatura ambiente (25°/30°C) até o momento do uso.