

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
DESINFETANTES DE *Staphylococcus* Coagulase Positiva CAUSADORES DE
MASTITE SUBCLINICA EM VACAS**

Aila Fabiane Peixoto
Médica Veterinária

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL
Março de 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
DESINFETANTES DE *Staphylococcus* Coagulase Positiva CAUSADORES DE
MASTITE SUBCLINICA EM VACAS**

Aila Fabiane Peixoto

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Co-Orientador: Dr. José Wilton Pinheiro Junior**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL

Março de 2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

P379p Peixoto, Aila Fabiane.
Produção de biofilme e perfil de sensibilidade aos desinfetantes de
Staphylococcus Coagulase Positiva causadores de mastite subclínica em vacas/
Aila Fabiane Peixoto. – 2017.
51 f. : il.

Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.
Coorientador: José Wilton Pinheiro Junior.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Rio
Largo, 2017.

Bibliografia; f. 41-51.

1. Adesão bacteriana. 2. Biofilme. 3. Desinfetante. 4. Pós-dipping.
5. Mastite – Bovino. 6. *Staphylococcus*. I. Título.

CDU: 636.2:661.16

TERMO DE APROVAÇÃO

AILA FABIANE PEIXOTO

PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS DESINFETANTES DE *Staphylococcus* coagulase positiva CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS

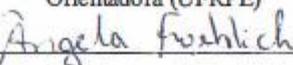
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

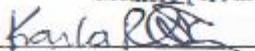
Aprovado em 3/3/2017


Prof.ª Dr.ª Elizabeth Sampaio de Medeiros

Orientadora (UFRPE)


Prof.ª Dr.ª Angela Froehlich

Membro (IFAL)


Prof.ª Dr.ª Karla Patrícia Chaves da Silva

Membro (UFAL)

Rio Largo – AL

2017

Dedico...

*A todos aqueles que acreditam no meu potencial e
na minha capacidade de lutar para alcançar meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter me abandonado, sempre ter guiado e iluminado os meus caminhos e por não me deixar desistir apesar de todas as dificuldades.

Aos meus queridos pais José Ailton e Maria Cícera, que mesmo distantes sempre me deram forças, me incentivaram em todos os momentos e compreenderam minha ausência em toda essa jornada.

Aos meus tios Adelvanda Peixoto e Eldísio Rodrigues, e primo Felype Peixoto, pelo incentivo e apoio de sempre! Afinal foi aí onde tudo começou!

Aos meus tios Denildo Peixoto e Zeleide, e primas Rayane e Rafaella, por toda preocupação, incentivo e apoio principalmente no início dessa jornada.

A tio João Peixoto e aos primos, Douglas Peixoto, Any Nataly e Dilma Peixoto, pelo abrigo, apoio, preocupação, conversas e amizade, principalmente quando eu voltava das coletas.

A irmã de coração, que Deus colocou no meu caminho, Maísa. Não tenho nem palavras pra agradecer tudo que tens feito por mim em todo esse tempo! A minha “gêmola” de outros pais, Shirley, por toda paciência, conversas e brincadeiras! A ajuda de vocês foi muito importante para concluir este trabalho! Acho que sem ela eu não teria conseguido! Muito obrigada!

Thiago Emanuel, obrigada pela presença na defesa e por aturar meus desabafos no zap! Seu esforço e força de vontade serviram de inspiração e incentivo para mim, principalmente nos momentos de cansaço e de vontade de jogar tudo pro alto.

A todos os demais membros da minha família, de sangue e de coração, que conhecem minhas lutas e mesmo estando um pouco distantes fisicamente, torcem por mim e vibram com minhas conquistas.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros, pela aceitação, pela orientação, paciência e principalmente, pelos ensinamentos a mim transmitidos. Temos mais uma etapa pela frente!

A meu Co-orientador, Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior, pelos conselhos, dicas, orientação, paciência e todos os direcionamentos que me deu.

Ao Prof. Dr. Gaus Andrade, pelo apoio, palavras de conforto, conselhos e por ter evitado a minha desistência do curso.

A ex coordenadora deste curso, Prof^a. Dr^a. Patrícia Mendes Guimarães Beelen, por apesar de nossas diferenças no início, sempre ter me estendido à mão e atendido minhas solicitações a distancia. Acho que conquistei sua confiança! Obrigada por tudo!

Aos Professores Mauro Tavares e Roger Beelem, por terem acreditado em mim e na minha capacidade quando muitos desacreditaram.

A meu “eterno” orientador e amigo Prof. Dr. Marcos Franque, por sempre ter confiado e acreditado em mim e por todas as palavras de incentivo.

A todos os professores com os quais tive a oportunidade de conviver, pelo conhecimento que comigo compartilharam.

A Lactalys do Brasil, especialmente a Marne Portela e Gilson Dourado, e todos os produtores envolvidos na pesquisa, dos quais o apoio e colaboração foram fundamentais para a realização deste estudo.

A Karla Danielle, Jéssica, Thayná e André pela imensa contribuição no laboratório durante a realização do experimento. Sem a ajuda de vocês teria sido tudo muito mais difícil.

A equipe da Coperata (meu lar em Recife), em especial Valéria, Míriam Camelo, Edy, Felipe, Patrícia, por todo apoio, torcida, amizade e paciência! Vocês foram por vários momentos como uma família pra mim.

A todos os amigos da turma 2015.1 de Pós Graduação em Zootecnia – CECA/UFAL, que apoiando uns aos outros conseguimos ao longo do curso ultrapassar os obstáculos e chegar até o fim.

A todos os amigos, amigas e familiares pela compreensão e amizade.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o meu mais profundo agradecimento.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a capacidade de *Staphylococcus Coagulase Positiva* (SCP), isolados de amostras de leite em casos de mastite subclínica bovina da Bacia Leiteira do Estado de Alagoas, produzirem biofilmes e sua sensibilidade aos agentes desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*. Foram selecionadas 10 propriedades situadas em municípios da bacia leiteira do Estado de Alagoas, que forneciam leite para laticínio sob inspeção federal. Foi realizado o teste CMT em 1155 vacas e coletadas as amostras CMT positivo a partir de 2+, totalizando 891 amostras que foram submetidas ao exame microbiológico para isolamento e identificação de SCP, totalizando 148 isolados. A capacidade de produção de biofilmes foi determinada pelo teste de aderência em microplacas. Para avaliar a ação “*in vitro*” dos desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping* foram utilizados os seguintes princípios ativos: ácido láctico (2%), alantoína (0,05%), iodo (0,5%), clorexidine (2,0%), cloro (2,5%), nos tempos de 15”, 30” e 60”. O teste de aderência em microplacas demonstrou que 91,2% (135/148) dos isolados de SCP foram capazes de formar biofilme; destas, 22,2%, 29,6% e 48,2% apresentaram-se como fortes, moderadas e fracas produtoras, respectivamente. O perfil de sensibilidade dos isolados frente à clorexidine foi de 83,78%. Quanto ao iodo, observou-se 66,22% de sensibilidade. Para a alantoína, os isolados apresentaram sensibilidade de 37,74%. Ao ácido láctico, 22,3% das amostras foram sensíveis, e ao cloro, observou-se que 17,57% dos isolados foram sensíveis. A maioria dos isolados foi capaz de produzir biofilmes, habilidade esta associada ao potencial dos microrganismos causarem infecções persistentes e de difícil tratamento. A melhor atividade desinfetante “*in vitro*” foi observada para clorexidine e iodo e ressalta-se a importância da avaliação periódica da eficácia dos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras da região estudada.

Palavras-Chave: Adesão bacteriana. Alagoas, Desinfetantes, Pós dipping, Mastite, *Staphylococcus*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the ability of *Staphylococcus Coagulase Positive* (SCP), isolated from milk samples in cases of bovine subclinical mastitis in the Leiteira Basin of the State of Alagoas, to produce biofilms and their sensitivity to disinfectants used in pre and post dipping . We selected 10 properties located in municipalities of the state of Alagoas, which supplied dairy milk under federal inspection. The CMT test was performed in 1150 cows and CMT positive samples were collected from 2+, totaling 891 samples that were submitted to microbiological examination for isolation and identification of SCP, totaling 148 isolates. The biofilm production capacity was determined by the microplate adhesion test. To evaluate the in vitro action of the disinfectants used in pre and post dipping the following active principles were used: lactic acid (2%), allantoin (0.05%), iodine (0.5%), chlorhexidine 0%), chlorine (2.5%), at the times of 15 ", 30" and 60 ". The adhesion test on microplates showed that 91.2% (135/148) of SCP isolates were able to form biofilm; Of these, 22.2%, 29.6% and 48.2% presented as strong, moderate and weak producers, respectively. The sensitivity profile of the isolates against chlorhexidine was 83.78%. As for iodine, we observed 66.22% sensitivity. For allantoin, the isolates had a sensitivity of 37.74%. For lactic acid, 22.3% of the samples were sensitive, and for chlorine, it was observed that 17.57% of the isolates were sensitive. Most isolates were able to produce biofilms, an ability associated with the potential of microorganisms to cause persistent and difficult to treat infections. The best in vitro disinfectant activity was observed for chlorhexidine and iodine and the importance of the periodic evaluation of the efficacy of the disinfectants used in the dairy properties of the studied region is emphasized.

Keywords: Bacterial adhesion. Alagoas, Disinfectants, Dipping powders, Mastitis, *Staphylococcus*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes.....23
- FIGURA 2. Formação de biofilme por *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016.....32
- FIGURA 3. Classificação da capacidade de formação de biofilme por *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016, de acordo com STEPANOVIC et al. (2003).....34
- FIGURA 4. Perfil de sensibilidade “in vitro” dos desinfetantes utilizados no pré e pós dipping em propriedades leiteiras frente à *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016.....35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Produção de leite no Brasil.....	13
2.2	Produção de leite no estado de Alagoas	14
2.3	Mastite bovina e produção animal.....	14
2.3.1	Testes para diagnóstico da mastite	16
2.4	<i>Staphylococcus spp</i> e <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	18
2.5	Biofilmes	20
2.5.1	Composição dos Biofilmes	21
2.5.2	Teorias da formação de biofilmes.....	22
2.5.3	Fatores que influenciam a formação do biofilme	24
2.6	Desinfetantes no Controle das Mastites	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Área de estudo e coleta de material	29
3.2	Isolamento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP).....	29
3.3	Caracterização fenotípica da produção de biofilme	30
3.4	Teste de sensibilidade “ <i>in vitro</i> ” aos desinfetantes	30
3.5	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÕES	39
6	IMPLICAÇÕES	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil é um dos setores mais importantes para a economia do país, com crescimento significativo, essa atividade gera empregos para milhões de brasileiros. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite com produção de 30.523 mil toneladas de acordo com os dados da FAO (2016). O estado de Alagoas ocupa a 18ª posição no *ranking* nacional dos estados produtores de leite, com uma produção de 70.036 mil litros em 2015 (BRASIL, 2016a).

A qualidade do leite cru produzido em diversas regiões do Brasil é considerada insatisfatória. Este fato está relacionado à taxa de multiplicação dos microrganismos contaminantes (YAMAZI et al., 2010). A contaminação do leite cru por patógenos é realidade no Brasil e tem importância na produção animal e na saúde pública (DIEDRICH et al., 2013).

A mastite é uma das enfermidades que mais causa prejuízos à produção e industrialização do leite, por reduzir a qualidade e a quantidade do produto (SAEKI et al., 2011). *Staphylococcus* coagulase positiva, são os principais agentes etiológicos da mastite nos rebanhos do Brasil e do mundo (SANTANA et al., 2010); causando grandes prejuízos aos produtores, à indústria e provocando riscos à saúde pública (SANTOS et al, 2010). São responsáveis por vários casos de mastite clínica e subclínica no rebanho leiteiro, e sua virulência depende da produção de exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares contendo várias camadas, sendo sua habilidade de aderência ao epitélio da glândula mamária associada à produção de biofilmes (MELO, 2008), capacidade que é reconhecida como uma vantagem fisiológica na sua possível atuação como agente etiológico (MEIRA, 2011).

Em um biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como os desinfetantes usados nos procedimentos de higienização (SANTOS, 2009). Sendo que um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção seria a rede de exopolissacarídeos (EPS), que age como barreira física, impedindo que esses agentes cheguem a seus sítios de ação (BOARI et al, 2009).

Diversas medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que

podem ser transferidos ao leite prejudicando sua qualidade microbiológica (AMARAL et al. 2004). Uma das medidas recomendadas é o uso adequado de agentes desinfetantes, que tem como objetivo reduzir a população de microrganismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos (RAMALHO et al, 2012), o que tende a controlar e até mesmo diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária (MEDEIROS et al, 2009)

Objetivou-se com esse estudo avaliar a capacidade de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), isolados de amostras de leite em casos de mastite subclínica bovina na Bacia Leiteira do estado de Alagoas, produzirem biofilmes e sua sensibilidade aos agentes desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite no Brasil

A produção nacional de leite em 2015 foi estimada em 35 bilhões de litros, representando uma retração de 0,4% em relação ao ano anterior, devido ao aumento dos custos de produção, associado ao baixo preço do leite pago ao produtor, desestimulando muitos produtores a investirem na produção, levando alguns deles a secarem suas vacas (BRASIL, 2016b). Essa produção coloca o Brasil em sexto lugar no “*ranking*” mundial dos países produtores; no setor primário, são 1,3 milhão de propriedades produzindo leite distribuídas por todo o território. Há registro da atividade leiteira em 99% dos municípios brasileiros, com um rebanho de quase 22 milhões de vacas ordenhadas. O leite brasileiro movimenta a economia de pequenas cidades, ajuda na distribuição de renda e gera emprego permanente, principalmente no meio rural (ZOCCAL, 2016).

Em 2015, o valor bruto da produção foi de R\$ 34,71 bilhões, considerando um preço médio nacional de R\$ 0,99 por litro de leite que foi captado e processado nas indústrias. O maior preço médio foi encontrado no Nordeste (R\$ 1,18 por litro), enquanto o menor, no Norte do País (R\$ 0,87 por litro) (BRASIL, 2016b). No 3º trimestre de 2016 o preço médio bruto do leite foi de R\$ 1,61 por litro, sendo 27,0% maior que o alcançado no trimestre anterior e 50,2% maior que o registrado no terceiro trimestre de 2015 (BRASIL, 2016a).

No 3º trimestre de 2016, a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária (Federal, Estadual ou Municipal) foi de 5,84 bilhões de litros. Esse volume foi 12,1% maior que o do trimestre anterior e 2,6% menor que o do 3º trimestre de 2015. (BRASIL, 2016a).

A região Sul ocupa a primeira posição do “*ranking*” das grandes regiões, com 35,2% da produção nacional, seguida da região Sudeste, com 34,0% da produção total. O Nordeste ocupa a quarta posição com 12% da produção (BRASIL, 2016b).

Na Região Nordeste, a maior produção de leite é observada nos municípios da Região Semiárida, sendo que, as maiores e mais conhecidas bacias leiteiras estão localizadas na região de transição do agreste para o sertão, onde as chuvas são mais frequentes e, conseqüentemente, a atividade leiteira passa a ser mais intensificada (EMBRAPA, 2016).

2.2 Produção de leite no estado de Alagoas

O setor leiteiro conquistou espaço importante na economia e produtividade em Alagoas. Atualmente, o segmento é o segundo que mais gera emprego e renda, perdendo apenas para a cana de açúcar, e se concentra na bacia leiteira do Estado, no sertão e agreste alagoano (DANTAS, 2011; SEAGRI - ALAGOAS, 2016).

O estado de Alagoas ocupa a 18ª posição no *ranking* nacional dos estados produtores de leite, com uma produção de 70.036 mil litros em 2015 (BRASIL, 2016a). No 3º trimestre de 2016, a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção sanitária no estado (Federal, Estadual ou Municipal) foi de 12.794 mil litros (BRASIL, 2016a).

A característica básica da atividade leiteira dessa região é a utilização de tecnologias na produção, especialmente no arraçamento do gado e na linhagem do rebanho, que é predominantemente de origem mista, raça Girolanda, apresentando produtividade elevada em relação à média regional e nacional. Com relação a nutrição, o que mais a caracteriza é o uso de alimentos concentrados e da palma forrageira. Além da produção de leite *in natura* o estado conta ainda com indústrias processadoras e beneficiadoras do leite, com produção de derivados (BNB, 2005).

2.3 Mastite bovina e produção animal

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que ocorre em todos os países do mundo, apresenta etiologia complexa e multivariada, o que torna necessária a identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003). O processo inflamatório instalado tem como objetivo eliminar microrganismos infecciosos, neutralizar toxinas, auxiliar na reparação do tecido afetado e tem papel importante no reestabelecimento das funções fisiológicas da glândula mamária. A intensidade da inflamação varia dependendo da forma como o úbere reage frente à fonte de irritação, podendo ocorrer de forma subaguda, aguda, superaguda ou crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2000; LADEIRA, 2007; MASSEI et al., 2008).

O processo inflamatório ocorre como consequência da interação de fatores relacionados ao animal, patógeno e ambiente; pode ser de origem tóxica,

traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, destacando-se as de origem bacteriana, responsáveis por aproximadamente 90% dos casos (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO, 2000; FREITAS et al., 2005).

A enfermidade apresenta-se de duas formas, podendo ser classificada como clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta como sinais evidentes, edema, hipertermia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. A forma subclínica se caracteriza por alterações na composição do leite, porém não evidentes, entre as principais alterações destacam-se o aumento da contagem de células somáticas, aumento dos teores de cloreto de sódio, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura sólido total e lactose do leite (TOZZETTI et al., 2010).

Os agentes envolvidos na casuística da mastite bovina são classificados em: contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasmas bovis*); patógenos ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.); patógenos secundários ou menores (*Staphylococcus coagulase negativa*); e patógenos incomuns (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, algumas espécies de bactérias anaeróbias, fungos filamentosos e leveduras) (MENDONÇA et al., 1999; RADOSTITIS et al., 2002; ANDRADE, 2006; QUINN et al., 2005; BUITENHUIS et al., 2011).

O principal reservatório dos agentes contagiosos é o úbere de um animal infectado, e as infecções são disseminadas entre as vacas ou entre os quartos mamários durante a ordenha por meio de equipamentos contaminados, mãos dos ordenhadores, ou panos usados em mais de uma vaca. Neste caso, as infecções tendem a persistir na glândula mamária apresentando-se na forma subclínica com episódios clínicos intermitentes. A fonte principal de agentes ambientais é o próprio local onde a vaca vive e a mastite ambiental apresenta-se mais na forma clínica que subclínica; e é caracterizada como uma infecção curta, que resulta em queda brusca da produção de leite, e até mesmo, a morte da vaca (SANTOS E TOMAZI, 2012).

Diversos microrganismos, representados principalmente por bactérias, vírus, algas e fungos, estão envolvidos na mastite (COSTA et al., 2008), sendo as mastites

causadas por *Staphylococcus aureus*, principal espécie de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, as que mais prevalecem mundialmente (STANFORD et al., 2006) , pois esse agente é reconhecido como o principal patógeno da mastite bovina (ZAFALON et al., 2008).

A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira (RIBEIRO et al., 2003). Os prejuízos causados pela mastite incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, redução da produção de leite em razão da mastite clínica e subclínica, descarte do animal ou perda do quarto mamário, risco de transmissão da infecção para outras vacas, além do risco de veiculação de patógenos aos alimentos (SANTOS et al., 2010, KEFEE, 2012).

Estima-se que no rebanho brasileiro a prevalência da doença seja de 20 a 38%, o que representaria uma perda de 12 a 15% da produção (EMBRAPA, 2016). Santos e Fonseca (2007), distribuem o percentual do prejuízo causado pela mastite em um rebanho, como sendo 8% atribuído a gastos com tratamento, 8% com descarte de leite, 14 % com morte ou descarte prematuro e 70% com a redução da produção de leite; sendo os três primeiros atribuídos a casos de mastite clínica e o último a casos de mastite subclínica. Lopes et al,(2012), ao avaliarem o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros, estimaram que o impacto econômico anual da mastite foi de R\$ 72.784,74; R\$ 160.481,82 e R\$ 277.411,25, para frequências médias anuais de 1, 7 e 15%, respectivamente.

2.3.1 Testes para diagnóstico da mastite

O exame microbiológico é considerado o método laboratorial padrão para o diagnóstico da mastite bovina e seu principal objetivo é oferecer resultados seguros de forma que permitam a ação de medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente ou para a higiene da ordenha que podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 1999). A identificação do agente causador da mastite é de extrema importância, não apenas para o controle da mastite, mas, para a tomada de decisões no rebanho, no que se refere a recomendações de tratamento e descarte (FONSECA e SANTOS, 2001).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito através dos sinais clínicos, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras

secreções patológicas (DIAS, 2007), e/ou através do uso da caneca de fundo preto ou caneca telada antes de cada ordenha, onde são desprezados os primeiros jatos e visualizam-se as alterações macroscópicas do leite (RIBEIRO et al., 2003).

No diagnóstico da mastite subclínica, é observado se houve um aumento na Contagem de Células Somáticas (CSS) no leite (DURR, 2012) e existem várias maneiras de se estimar ou de efetivamente contá-las.

O método mais utilizado para auxiliar o diagnóstico da mastite subclínica é o “California Mastitis Test” (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957). É prático, barato e pode ser realizado ao lado dos animais, fornecendo resultados imediatos. 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 (BRITO et al., 2002; MELO, 2008). O resultado é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade em cinco escores que são: negativo, traço, leve (+), moderada (++) e severa (+++) (RIBEIRO et al., 2003). A desvantagem do CMT é que ele apenas estima o conteúdo de células de forma subjetiva (BRITO et al., 2002). Para Langoni (2000), a subjetividade do resultado do CMT representa um aspecto negativo, principalmente no que se refere a dosagens erradas de reagente e de leite e da falta de padronização da leitura, que estará sujeita a variações, de acordo com o profissional que estará realizando o teste.

O Wisconsin Mastitis Test (WMT), também chamado de viscosímetro, é o resultado do aprimoramento do CMT, tendo a finalidade de eliminar a subjetividade da interpretação dos resultados deste teste. É realizado em tubo graduado, ao qual adicionam-se quantidades exatas de leite e reagente (o mesmo utilizado para o CMT) (LANGONI, 2000). O reagente irá agir sobre as células somáticas do leite formando um gel viscoso na presença de alterações como a mastite. Como o tubo é graduado, o resultado será expresso em milímetros, de acordo com a maior ou a menor viscosidade da reação, acrescentando-se, à leitura do teste, quatro zeros ao número constatado (OLIVEIRA, 2012).

Uma maneira de se contar efetivamente as células somáticas dependem do envio de amostras de leite retiradas diretamente do tanque e enviadas a um laboratório especializado da Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite, ou por meio da contagem de células somáticas individual, em que as amostras são

retiradas de cada vaca e enviadas ao laboratório (FONSECA e SANTOS, 2001). A CCS é feita em equipamentos automatizados que possibilita o exame de grande número de amostras. Outro modo de se contar as células somáticas é pelo exame microscópico de lâminas coradas, porém é mais laborioso, caro e não permite automação (BRITO et al., 2002). A CCS do leite de vacas sadias é menor que 200.000 cel./ml e quando o processo inflamatório se instala este número tende a se elevar (SANTOS e FONSECA, 2007).

2.4 *Staphylococcus spp* e *Staphylococcus Coagulase Positiva*

Os estafilococos são cocos gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não de gás, não fotossintéticos, não esporulados e catalase positivos, com capacidade de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com desenvolvimento entre 7°C e 48°C, sendo a temperatura ótima de 37°C, e em pH na faixa de 4,0 a 10,0, com ótimo de 6,0 a 7,0. Crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que parcialmente explica porque podem crescer e sobreviver nas secreções nasais, pele, alimentos que apresentam alta pressão osmótica ou em alimentos com pouca umidade e tendem a inibir o crescimento de outros microrganismos (KLOOS; BANNERMAN, 1999; TORTORA et al., 2005).

Staphylococcus spp. são os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas associadas a falhas no manejo na ordenha, bem como, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, uma vez que a transmissão dos agentes causadores ocorre predominantemente durante a ordenha, já que o reservatório de microrganismos desse gênero é a glândula mamária (ANDRADE, et al., 2009). Mota et al.,(2012), observaram 39,3% de participação dos *Staphylococcus spp* na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco. No mesmo Estado, Barbalho e Mota (2001) avaliaram 104 amostras de leite provenientes de 43 animais e demonstraram que as bactérias do gênero *Staphylococcus spp* foram isoladas em 50 amostras, correspondendo a 38,8%.

Bactérias deste gênero podem ter contato com o leite ainda no ambiente intramamário, tendo em vista que são agentes etiológicos da mastite clínica e

subclínica (BANDEIRA et al., 2013). De acordo com Correa et al., (2009), este grupo microbiano é provavelmente carregado para o leite a partir das infecções da glândula mamária.

Existem 47 espécies e 24 subespécies de *Staphylococcus* e são divididos em dois grupos baseado na habilidade de coagular o plasma, de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (ELZÉBY, 2013). Sendo a maioria das espécies coagulase-negativa, caracterizando-se a exclusividade da síntese desta enzima aos *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*, sendo estas espécies então chamadas de coagulase-positivas (BANNERMAN, 2003; SANTOS, 2009).

Staphylococcus coagulase positiva, em especial o *Staphylococcus aureus* são os principais agentes etiológicos da mastite e cepas dessa bactéria podem produzir enterotoxinas capazes de causar toxinfecções alimentares, representando risco para saúde pública (SANTANA et al., 2010; PINTO, et al., 2011). A presença dessas espécies como, em alimentos é comum, principalmente por se tratar de um microrganismo que está em contato frequente com o homem e os animais, e pode facilmente desencadear surtos de intoxicações alimentares (DIEDRICH et al., 2013).

Pyorala e Taponen (2009) apontam para a emergência de *Staphylococcus* coagulase-negativos como microrganismos causadores de mastite, sendo responsáveis pela perda da qualidade do leite, gerando prejuízos econômicos ao produtor e a indústria leiteira. Mota et al.,(2012), ao estudarem a participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco, observaram que 58,4% dos isolados foram classificados como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 28,9% como *Staphylococcus aureus* e 12,7% como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP).

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. Sendo um dos patógenos mais abundantes isolados do leite cru brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011). 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 (MELO, 2008).

Segundo Mota, (2008), vários fatores podem interferir na evolução da infecção estafilocócica para benigna ou gangrenosa na glândula mamária, como: fluxo de ordenha, concentração de fagócitos no leite, taxa de anticorpos frente às toxinas e encapsulamento bacteriano. Meira (2011) ressalta que os *Staphylococcus* são susceptíveis a altas temperaturas e as soluções desinfetantes e antissépticas, tendo o *S. aureus* a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, lipase e termonuclease, que são considerados como fatores de virulência; sendo a patogenicidade de uma cepa específica de *S. aureus* atribuída ao efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas, juntamente com propriedades invasivas, tais como aderência, formação de biofilme e resistência a fagocitose.

2.5 Biofilmes

A maioria das bactérias vive em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas, geralmente compondo biofilmes (CAIXETA, 2008).

Biofilmes correspondem a comunidades de bactérias constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, que estão aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros orgânicos extracelulares (COSTERTON et al. (1999); BOARI et al, 2009; SALIMENA, 2014). Nesta estrutura, as bactérias passam da forma planctônica para a vida sésil e as modificações na fisiologia e resistência aos diversos tipos de estresse são evidentes (O' TOOLE et al., 2000). Sendo, portanto um tipo de organização extremamente vantajosa a todas as espécies de microrganismos por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (MELO, 2008).

Estas estruturas naturalmente ocorrem em variados tipos de ambientes e devido a sua ocorrência natural, pesquisas sobre a sua formação em superfícies utilizadas na produção de alimentos, vêm recebendo destaque, principalmente no que se refere aos malefícios de sua presença (BOARI et al. 2009).

A formação de biofilmes é considerada suspeita de ser o meio através do qual os *Staphylococcus* causadores de mastites fogem do sistema imune e causam infecções intramamárias persistentes (SIMOJOKI et al. 2012). Na indústria de laticínios, a formação de biofilmes dentro da linha de produção eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos, devido ao

eventual desprendimento de porções aderidas podendo colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em decorrência da diminuição da vida de prateleira dos produtos (SANTOS, 2009).

Melo (2008) ressalta ainda que 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. E segundo Santos (2009), os microrganismos agrupados em um biofilme estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como os desinfetantes frequentemente usados nos procedimentos de higienização, quando comparados às células isoladas no ambiente.

2.5.1 Composição dos Biofilmes

A composição dos biofilmes é bastante heterogênea, devido à presença do grande número de variados microrganismos com várias propriedades fisiológicas e metabólicas como resposta ao pH e requerimentos nutricionais (MELO, 2008), contudo, estudos sobre a estrutura do biofilme o têm revelado como sendo constituído principalmente por células microbianas e exopolissacarídeos (EPS) e que apesar do EPS variar em suas propriedades físicas e químicas, sabe-se que sua principal constituição é por polissacarídeos.

A matriz de polímeros extracelulares (EPS) de natureza polissacarídica ou protéica é conhecida como glicocálice e expõe-se à membrana externa das células gram negativas e ao peptidoglicano das células gram positivas (MELO, 2008). É produzida por polimerases e constitui-se em uma estrutura composta de diversas fibras de polissacarídeo ou proteínas globulares, contendo em seu estado hidratado cerca de 98 a 99% de água, substância que é considerada como principal componente dos biofilmes (FIGUEIREDO, 2000).

A rede de EPS é responsável por conferir proteção ao biofilme, pois funciona como barreira física impedindo que os agentes químicos, como os desinfetantes cheguem a seus sítios de ação, também é capaz de adsorver cátions, metais e toxinas e conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI et al. 2009).

Os biofilmes também 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 (MELO, 2008).

No interior do biofilme existe ainda a presença de poros e estes tem várias funções, como o transporte facilitado com difusão passiva ou com o auxílio de água que ocorre através de capilaridade especial, em que o transporte de moléculas no interior do biofilme e a perda celular são secretados através desses canais, e acredita-se que os canais de água participem do transporte de oxigênio no interior do biofilme (CAIXETA, 2008). Esses canais circulam entre as estruturas nos biofilmes e também permitem a aquisição e troca de genes por transferência horizontal (WUERTZ et al., 2004).

2.5.2 Teorias da formação de biofilmes

A formação de biofilmes foi detectada e relatada em 1943 por Zobell, mas somente a partir da década de 1970 é que diversos estudos têm sido concentrados em identificar e entender sua formação (COSTERTON et al., 1999).

A formação do biofilme ocorre por uma série de eventos sequenciais, em que a adesão inicial das bactérias planctônicas à superfície é seguida por proliferação e acúmulo de camadas de células, formando a comunidade microbiana, embebida em matriz de exopolissacarídeo produzida por si mesma. Contudo esse processo pode ser limitado por características do microrganismo, do material aderente e do meio envolvendo o microrganismo, como pH, temperatura, tempo de agitação, entre outros fatores (CAIXETA, 2008).

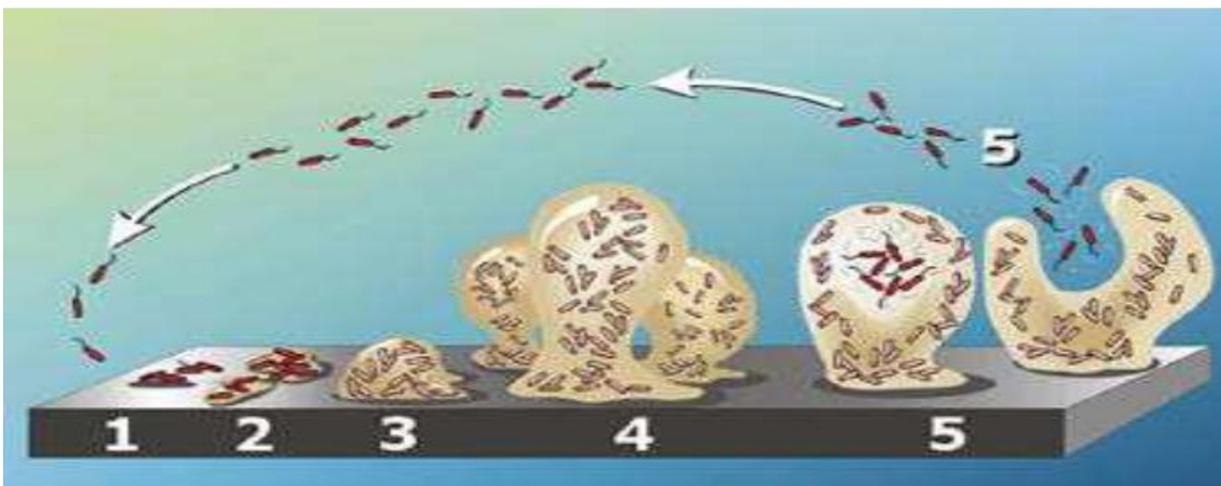
Melo (2008), ressalta que existem várias teorias para a formação de biofilmes. A primeira delas foi descrita por Marshall et al. em 1971, a qual relata que a adesão em superfícies é um processo que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, pois os microrganismos estão fracamente 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 proposta por Duddridge e Pritchard em 1983, 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 adesão bacteriana, por atração eletrostática, ainda reversível; multiplicação celular colonização e adesão irreversível (MELO, 2008).

A teoria mais comum para a formação de biofilme propõe que o processo ocorre em cinco estágios (Figura 1). Primeiramente, ocorre o ataque reversível de bactérias planctônicas que se aproximam da superfície sólida por fluxo fluido ou por motilidade, que tem domínio sobre as forças repulsivas entre a célula e a superfície. No segundo estágio, ocorre a transição do ataque reversível para não reversível, pela produção de polímeros extracelulares pela própria bactéria, e/ou por adesinas específicas localizadas na pili ou fimbrias, que interagem com a superfície. O terceiro estágio consiste no desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. O quarto estágio refere-se à formação de microcolônias dentro do biofilme maduro; ao mesmo tempo em que substâncias poliméricas extracelulares podem continuar sendo formadas, bem como canais de água e poros. No estágio final, ocorre a dispersão de células do biofilme e o retorno de células planctônicas (STOODLEY et al., 2002; MONROE, 2007).

Figura 1. Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes. 1- adesão inicial e reversível das células bacterianas na superfície; 2- produção de EPS, tornando a adesão irreversível; 3 e 4- desenvolvimento e maturação da arquitetura do biofilme; e 5- as células são dispersas do biofilme.



(STOODLEY et al., 2002; MONROE, 2007).

2.5.3 Fatores que influenciam a formação do biofilme

Os motivos pelos quais um microrganismo forma biofilmes são diversos e podem ser resumidos em: defesa, colonização do ambiente e crescimento em comunidade. Porém, vale ressaltar que as condições normais de qualquer hospedeiro ou do ambiente são hostis o suficiente para forçar os microrganismos a passarem a maior parte de sua existência crescendo na forma de biofilmes (JEFFERSON, 2004). Modificações ambientais como, por exemplo, temperatura e pH, são os fatores principais para o acionamento dos processos de formação do biofilme (APARNA; SARITA, 2008). Além disso, a formação do biofilme sofre interferência de vários outros fatores como a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, forças hidrodinâmicas, velocidade do fluxo, presença de agentes antimicrobianos, características do substrato em que o microrganismo se encontra, hidrofobicidade celular, mobilidade, estrutura celular, incluindo EPS e flagelo, concentração iônica, fase de crescimento da célula e concentração de células suspensas, bem como a concentração de metabólitos microbianos (NAVES et al., 2008; TRAVAGIN, 2010).

Ao formarem uma comunidade de microrganismos, as bactérias que vivem nos biofilmes passam a viver em grande proximidade com outras bactérias da mesma estirpe ou de espécies diferentes. Muitas desenvolveram mecanismos rudimentares de comunicação bacteriana, cujo fenômeno é conhecido por “*quórum sensing*” (NADELL et al., 2008). Em alguns casos, o crescimento do biofilme é também limitado pela expressão de moléculas do “*quórum-sensing*” (CAIXETA, 2008) e estudos 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 (MELO, 2008).

Inicialmente o “*quórum sensing*” foi descrito em bactérias Gram negativas, e há pouco tempo tem-se descoberto que biofilmes compostos por bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, também possuem esta capacidade (ANTUNES et al., 2010). Uma das vantagens descritas do mecanismo de “*quórum sensing*” é a rápida adaptação a alterações ambientais (OTTO, 2004). Outra vantagem evolutiva foi descrita como a de possibilitar às populações de bactérias presentes no biofilme distinguirem “self de non-self”, isto é “sentirem” a densidade

populacional de bactérias da mesma espécie/estirpe dentro de um biofilme que muitas vezes é composto por mais de um tipo de microrganismo (NOVICKE GEISINGER, 2008).

A adsorção de macromoléculas solúveis, como proteínas, sob a superfície sólida também pode influenciar na adesão microbiana, pois podem ocorrer diversas alterações nas propriedades da interface superfície/fluido, inibindo ou facilitando a colonização bacteriana (CAIXETA, 2008).

A superfície celular é considerada um significativo fator na ligação bacteriana á superfícies e a presença de flagelo, pili ou glicocálix podem aumentar a taxa de fixação de microrganismos (TRAVAGIN, 2010). A motilidade é considerada fator de virulência de bactérias patogênicas, por estar envolvida na colonização de organismos hospedeiros, onde promove o contato inicial da célula a superfície e o flagelo tem importante papel na motilidade e quimiostase na formação do biofilme (CAIXETA, 2008).

Estudos sugerem que a carga da superfície celular têm um importante papel nos estágios iniciais de adesão microbiana (TRAVAGIN, 2010) e 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 (MELO, 2008).

Ainda de acordo com Melo (2008), *Staphylococcus* spp, produzem uma ampla variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizarem e de causarem doenças em hospedeiros e quase todas as estirpes secretam enzimas e citotoxinas, as quais incluem hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lípases, hialuronidases e colagenase, sendo a principal função destas substâncias converter os tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários a sua multiplicação. 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, sendo sua síntese 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 (O' TOOLE et al., 2000). Arciola et al., (2001) e Vasudevan et al., (2003) demonstraram que os genes *icaA* e *icaD* tem importante papel na formação dos biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*.

2.6 Desinfetantes no Controle das Mastites

A eficiência dos produtos usados no manejo de ordenha é de fundamental importância para o sucesso na atividade leiteira, sendo assim um ponto crítico para o controle da mastite. A maneira mais eficaz de controle é a prevenção por meio de testes de monitoramento periódicos e assepsia (MASSEI et al., 2008), a qual é realizada através da utilização de desinfetantes.

Desinfetantes, sanitizantes ou biocidas podem ser definidos como qualquer substância que contém um ou mais agentes ativos, capazes de prevenir, inibir, diminuir ou eliminar a ação de células vegetativas de microrganismos de importância para a saúde pública e outros não patogênicos encontrados nas superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes (CAPELLETTI, 2006; CAIXETA, 2008); e representam ainda a contramedida mais significativa para controlar a formação de biofilmes. O uso desses compostos é de grande importância, porém requer minuciosa determinação quanto à concentração apropriada para aplicação (MEIRA, 2011). Segundo Passos (2004), os fatores que mais interferem no resultado da prática do pré ou do pós-*dipping* são a concentração dos componentes e a estabilidade química dos produtos.

Os produtos com ação desinfetantes podem ser classificados em bactericidas, quando são capazes de destruir os microrganismos; ou bacteriostáticos, os quais inibem o crescimento microbiano em superfícies vivas, como a pele intacta (MORÃO et al., 2015)

Diversas medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que podem ser transferidos ao leite prejudicando sua qualidade microbiológica (AMARAL et al. 2004). De acordo com Boddie, Nickerson e Andiksom, (1997), a desinfecção é uma das medidas mais importantes na prevenção de enfermidades e muitos desinfetantes foram desenvolvidos para uso na indústria leiteira. Morão et al.,(2015), relataram que o uso de desinfetantes na higienização de tetos e utensílios de ordenha tem sido empregada há muito tempo.

Em rebanhos leiteiros, a desinfecção dos tetos dos animais lactantes antes (pré *dipping*) e após a ordenha (pós *dipping*) é uma prática bastante conhecida que ajuda a prevenir e a controlar a incidência de mastite. Pela redução da contaminação da pele dos tetos, diminui-se o risco de entrada de microrganismos na

glândula mamária e, conseqüentemente, baixa-se a taxa de ocorrência de novas infecções intramamárias (PASSOS, 2004). Segundo Morini (2009) e Oliveira (2012), estudos apontam que a realização do pré *dipping* determina redução de até 50% na taxa de novas infecções da glândula mamária, causadas por patógenos ambientais. Vários trabalhos demonstraram a redução na taxa de novas infecções intramamárias após utilização de diferentes produtos para desinfecção de tetos (BODDIE, NICKERSON, e ADKINSON, 2000; BRITO, 2000)

O pré *dipping* é uma importante medida de controle contra a mastite ambiental, já que elimina da superfície dos tetos muitas bactérias oriundas do ambiente, evitando que penetrem nos quartos mamários durante a ordenha, embora apresente alguma eficácia no controle da mastite contagiosa. O pós-dipping tem o objetivo de eliminar os microrganismos presentes na pele dos tetos após o término da ordenha, sendo medida eficaz na prevenção de novos casos de mastite causados por microrganismos contagiosos (PASSOS, 2004; OLIVEIRA; 2012).

No pré *dipping* recomenda-se que o desinfetante utilizado permaneça em contato com a pele do teto do animal por trinta segundos e os tetos sejam secos com papel toalha antes da ordenha ou da colocação das teteiras. Enfatiza-se também que a imersão dos tetos, “*teat dipping*”, antes a após a ordenha, deve ser completa, isto é, pelo menos dois terços dos tetos devem ser imersos completamente na solução desinfetante. O melhor método de aplicação é o uso de canecas para imersão de tetos, especialmente as do modelo sem retorno (*one way*), que impedem o retorno da solução após a aplicação. O uso de *spray*, geralmente, está associado a uma cobertura incompleta dos tetos com solução desinfetante, não sendo muito recomendado (OLIVEIRA, 2012).

De acordo com o National Mastitis Council, (2004), devido ao sucesso da prática de antissepsia dos tetos na prevenção de infecções intramamárias, surgiram ao longo do tempo, várias soluções desinfetantes em diversas concentrações. Sendo os princípios ativos mais comuns utilizados na antissepsia de tetos, o iodo, clorexidine e cloro (MORÃO et al., 2015).

Dentre estes, destaca-se o iodo por reunir características desejáveis, tais como: amplo espectro de ação, estabilidade, facilidade de visualização após a aplicação e ausência de resíduos no leite quando utilizado de forma adequada. O mesmo possui alto poder de penetração nas células de microrganismos através da parede celular, levando à ruptura de proteínas. Por outro lado, sua eficácia é

reduzida na presença de matéria orgânica, elevação do pH e apresenta custo superior ao do cloro (SANTOS e FONSECA, 2007; MORÃO et al., 2015).

O clorexidine também é muito eficiente na desinfecção dos tetos, por apresentar amplo espectro e não ser inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica, como sangue, leite, pus e fluidos teciduais (SANTOS e FONSECA, 2007). Contudo, Passos (2004), relata que sua eficiência é reduzida quando o mesmo é utilizado na presença de água dura, pois ocorre a formação de sais insolúveis a partir da clorexidina. Com uma dureza de 20 ppm esse desinfetante começa a perder efetividade, e a partir de 200 ppm, torna-se inativo. A utilização de água clorada também pode formar um sal insolúvel com a clorexidina.

A utilização do cloro também é prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto é bom agente desinfetante e apresenta baixo custo. Entretanto, tem como desvantagem a sua pouca estabilidade, além da não observação dos produtores dos critérios de uso, sem análise do efeito residual ou da sua eficiência, o que pode interferir na qualidade do processo de desinfecção, fator este muito importante na prevenção da mastite (AMARAL et al., 2004). Seu mecanismo de ação é a desnaturação das proteínas da membrana celular microbiana, o que interfere no transporte de nutrientes e promove a perda de componentes celulares (MORÃO et al., 2015)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e coleta de material

O estudo foi desenvolvido na Região da Bacia Leiteira de Alagoas, que ocupa uma área de 5.053,2 km², correspondente aos municípios de Batalha, Belo Monte, Cacimbinhas, Dois Riachos, Estrela de Alagoas, Igaci, Jacaré dos Homens, Jaramataia, Major Isidoro, Minador do Negrão, Monteirópolis, Olho D'água das Flores, Olivença, Palmeira dos Índios, Pão de Açúcar, Santana do Ipanema e São José da Tapera (BNB, 2005).

Foram selecionadas 10 propriedades dos municípios de Batalha, Cacimbinhas, Major Isidoro e Minador do Negrão, que utilizavam sistema de ordenha mecânica que forneciam leite para um laticínio sob inspeção federal. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e em diferentes estágios de lactação, criados em sistema semi-intensivo.

No período de Abril a Junho de 2016 foi realizado o teste CMT em 1155 vacas e coletadas as amostras CMT positivo a partir de 2+, totalizando 891 amostras. A coleta foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (2004). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) foram utilizados tubos de ensaio esterilizados para acondicionar amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Os tubos contendo as amostras foram colocados em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e levados ao laboratório de Inspeção e Saúde Pública da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.2. Isolamento de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP)

Para a realização da cultura primária, uma pequena alíquota (0,5µL) de cada amostra foi plaqueada pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento em Ágar Sangue de ovino a 5% e incubados em estufa a 37°C; foram realizadas leituras com 24 e 48 horas. As características macroscópicas e microscópicas (morfo-tintóricas) das colônias foram avaliadas utilizando a técnica de Gram (CARTER, 1998). Testes de catalase e coagulase foram realizados para a identificação de SCP, utilizando-se como controle positivo na pesquisa a cepa *S. aureus* ATCC 29213.

3.3 Caracterização fenotípica da produção de biofilme

A capacidade de produção de biofilmes "*in vitro*" foi determinada de acordo com o método citado por Merino et al., (2009), com modificações. Os isolados de SCP foram cultivados em TSB (Tryptone Soya Broth) por 24 horas a 37°C. Logo após, uma porção de cada cultivo foi diluída a 1:40 em TSB adicionado de 0,25% de glicose. Cada amostra, já padronizada, foi colocada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo em "U", em triplicata, junto com controles, no volume de 200µL/cavidade. Após o período de incubação (37°C por 24h), as placas foram lavadas três vezes com água destilada, e deixadas secar à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µL de cristal violeta/cavidade, e a placa foi incubada por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Logo após, cada cavidade foi lavada três vezes com água destilada e acrescida de álcool-acetona (80:20). As placas coradas com cristal violeta foram submetidas à espectrofotometria para aferir as respectivas absorbâncias de cada cavidade. A absorbância foi determinada à 620 nm. Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco e as cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva). De acordo com Stepanovic et al. (2003) o controle negativo (OD) é usado como base para os cálculos da determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (OD_c). Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra: $OD \leq OD_c$ = não produtor, $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$ = fraco produtor, $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$ = moderado produtor, $(4 \times OD_c) < OD$ = forte produtor.

3.4 Teste de sensibilidade "*in vitro*" aos desinfetantes

Para avaliar o perfil de sensibilidade aos desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping* foram utilizados os seguintes princípios ativos: ácido láctico (2%), alantoina (0,05%), iodo (0,5%), clorexidine (2,0%), cloro (2,5%), sendo as diluições realizadas conforme orientação dos fabricantes. Para a análise foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas de solução salina estéril (5,5ml) correspondendo ao tubo 1 da escala de McFarland. A suspensão foi constituída pela solução desinfetante (0,8ml) e o leite estéril (0,2ml). Posteriormente, adicionou-se a suspensão bacteriana (1,2 ml) e cronometrou-se os tempos (15", 30" e 60") de exposição para então realizar o repique em caldo BHI. A mistura foi incubada a 37°C durante 24 horas para observação da turvação do meio, formação de película na superfície ou de

precipitado no fundo dos tubos. Após a incubação, a suspensão foi repicada em meio sólido (Ágar sangue) para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes desinfetantes e tempo de exposição. A ausência do crescimento bacteriano nas placas indicou a sensibilidade do SCP ao produto em questão (COSTA et al. 1998).

3.5 Análise estatística

Para a avaliação dos resultados foi realizada uma análise estatística descritiva determinando as frequências absolutas e relativas (BUSSAB e MORETTIN, 2004).

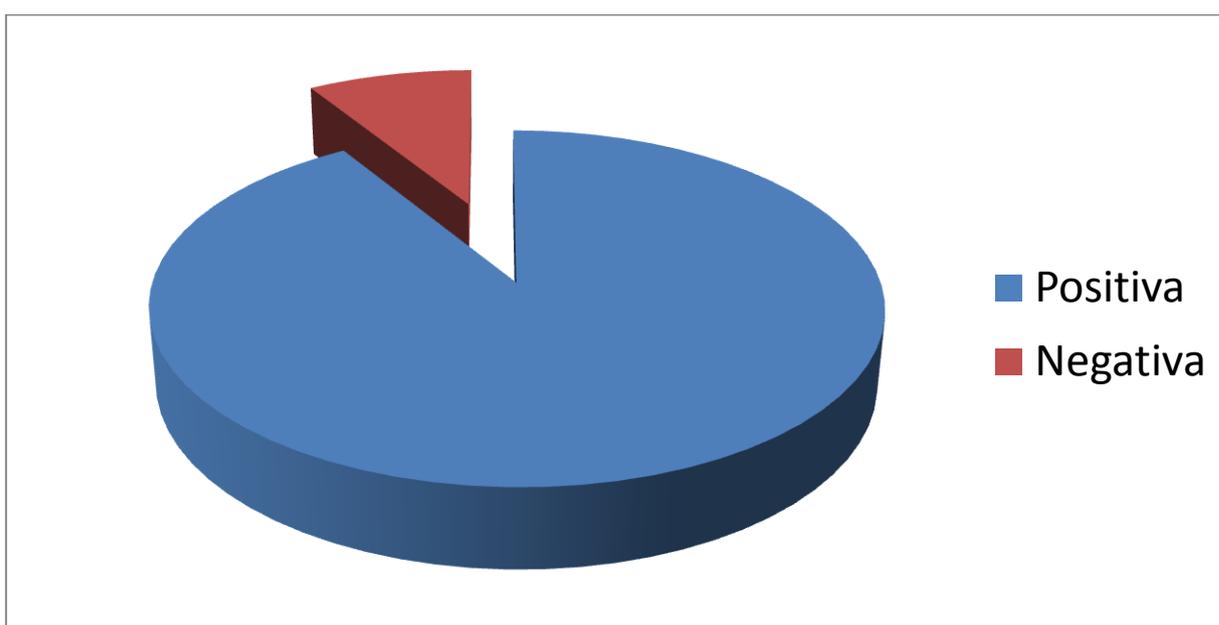
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar os 4620 quartos mamários, 0,32% (15/4620) eram afuncionais, 0,89% (41/4620) apresentaram mastite clínica, 74,22% (3429/4620) foram negativos ao teste CMT e 24,57% (1135/4620) apresentaram mastite subclínica. Destes últimos, 21,49% (244/1135) foram classificados como mastite leve (+), 43,96% (499/1135) moderada (++) e 34,54% (392/1135) severa (+++). Contudo para este estudo foram colhidas apenas amostras leite dos quartos mamários que apresentaram mastite subclínica moderada e severa, totalizando 891 amostras.

Do total de amostras de leite analisadas após cultivo e identificação microbiológica, foram isolados 251 *Staphylococcus* spp. dos quais 148 foram classificados com *Staphylococcus* coagulase positiva.

Os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foram submetidos ao teste de aderência em microplacas, onde 91,2% (135/148) demonstraram capacidade de formar biofilme (Figura 2). Esta capacidade de produção de biofilme pode estar relacionada ao potencial dos isolados causarem infecções crônicas e de difícil tratamento, pois acredita-se que a capacidade de formar biofilme, seja uma forma através da qual os microrganismos fogem do sistema imunológico, conseguindo se manter no interior da glândula mamária, causando infecções persistentes.

Figura 2. Formação de biofilme por *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016.



(PEIXOTO, 2016)

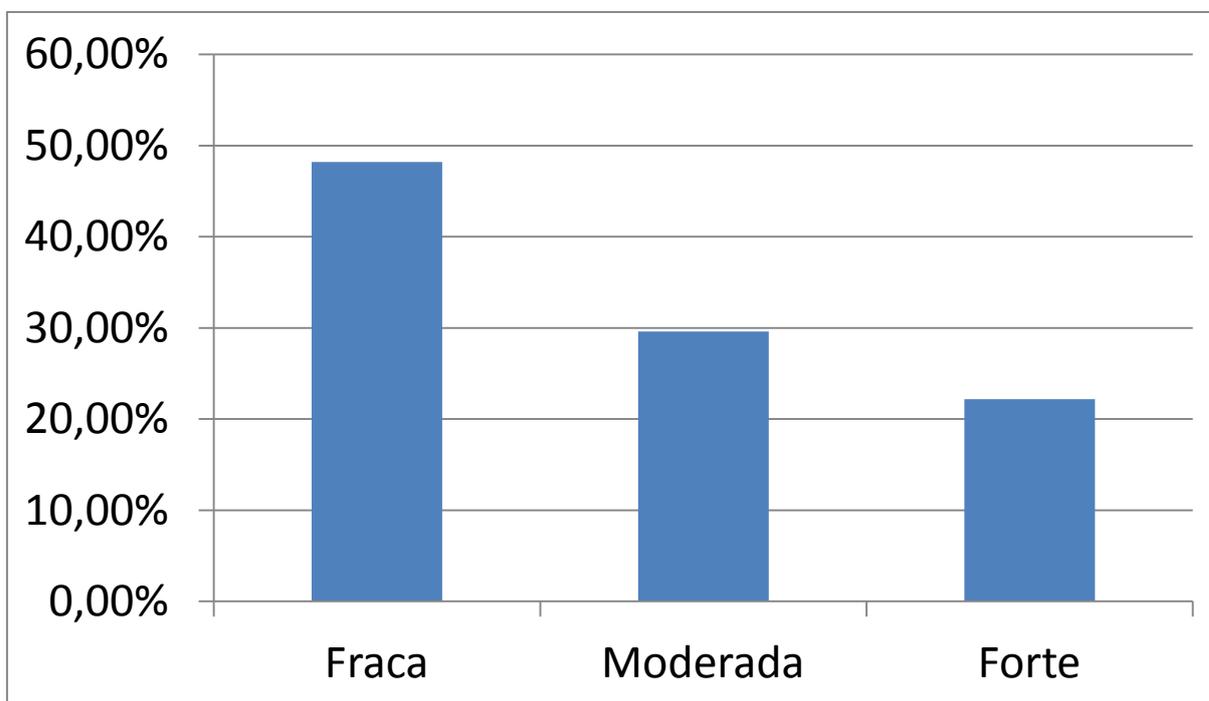
Resultado semelhante foi observado em estudo desenvolvido por Melo et al., (2012), ao avaliarem a produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina, provenientes de dois rebanhos no estado de São Paulo, no qual 98,9% das estirpes se aderiram à placa e foram consideradas produtoras de biofilmes. Noel et al. (2016), ao estudarem a produção de “Slime” de isolados de *Staphylococcus spp.* provenientes de casos de mastite bovina na Região Sul-Fluminense, também detectaram a produção de biofilme na técnica da microplaca, em 74,4% dos isolados.

Jain e Agarwal (2009) descreveram que a formação de biofilme é um fator de virulência importante para diversas bactérias, inclusive *Staphylococcus spp.* E a patogênese da mastite é atribuída à combinação de diversos fatores celulares e extracelulares, sendo a formação de biofilme um dos principais mecanismos para a infecção bacteriana persistente ou crônica (COSTERTON et al. 1999).

Além da habilidade dos *Staphylococcus* produzirem biofilmes ser um dos fatores de virulência para a mastite, também são um problema em relação ao tratamento das infecções, por permitir que os microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos, desinfetantes e da fagocitose pelo sistema imune, o que torna a mastite subclínica persistente (MELO, 2008). Essa proteção geralmente está associada ao fato de que, no biofilme os microrganismos estão envolvidos pela matriz de exopolissacarídeos, a qual impede que as substâncias químicas e as células de defesa tenham acesso às células microbianas.

A classificação da capacidade de formação de biofilme para as amostras positivas no teste de aderência em placas pode ser vista na Figura 3. Das 135 amostras que apresentaram capacidade de produção de biofilmes, 22,2% (30/135) apresentaram-se como fortes produtoras, enquanto 29,6% (40/135) e 48,2% (65/135) demonstraram formação moderada e fraca, respectivamente, o que pode estar relacionado às diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva existentes, e que não foram classificadas nesse estudo.

Figura 3. Classificação da capacidade de formação de biofilme por *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016, de acordo com STEPANOVIC et al. (2003).



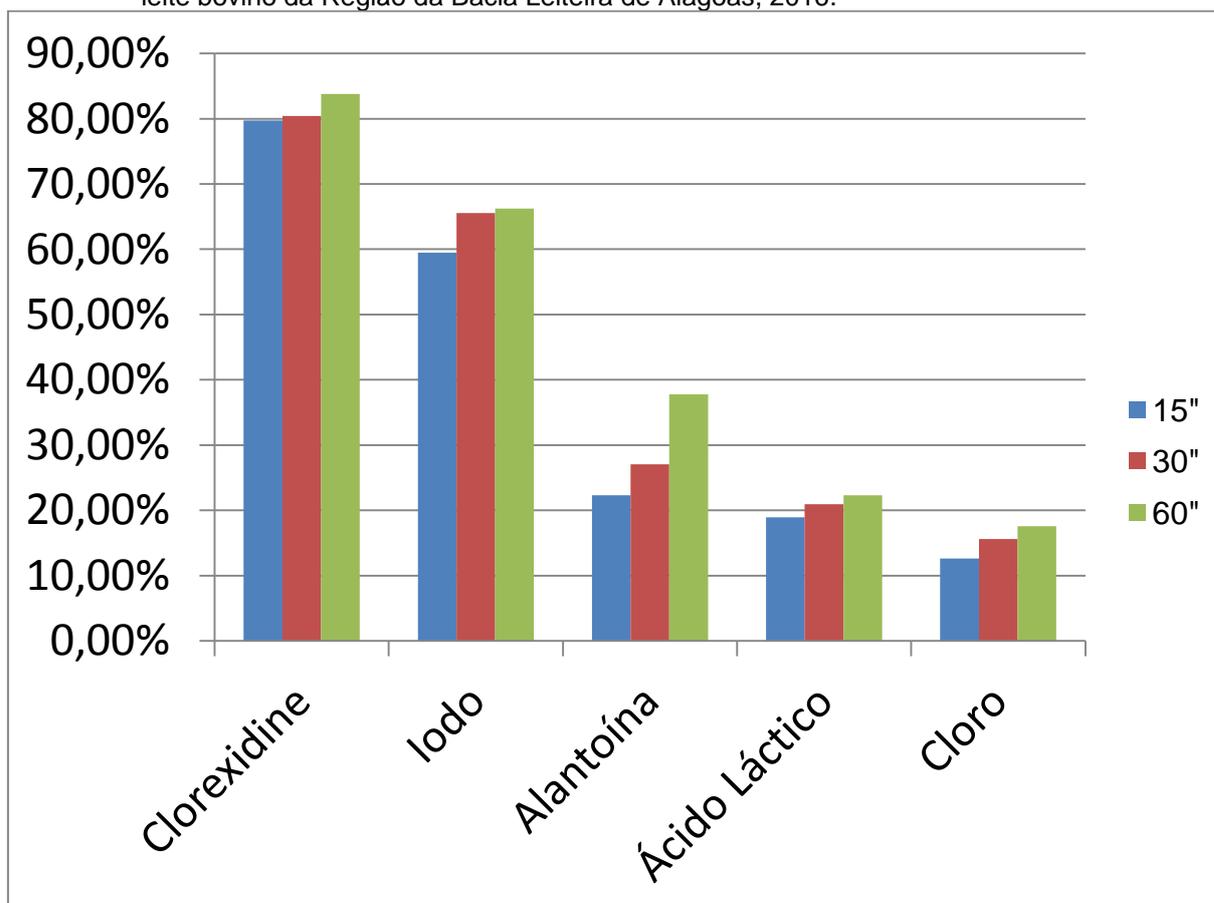
(PEIXOTO, 2016)

Em estudo realizado por Noel et al. (2016), sobre a produção de biofilme de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na Região Sul-Fluminense, não foram observados isolados com capacidade de produção de biofilme fraca e moderada, sendo 65% dos isolados classificados como forte produtores e 35% como fracos produtores e foi possível observar que diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. foram capazes de formar biofilme. Melo et al., (2012); estudando a produção de biofilmes por *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina, provenientes do estado de São Paulo, obtiveram resultados diferentes dos aqui observados, pois verificaram que a maioria (98,9%) das estirpes de *S. aureus* estudadas, se aderiram fortemente à placa de poliestireno.

Stepanovic et al. (2000), ressaltam que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp., além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos. Este teste cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pelos *Staphylococcus* sendo então possível verificar se as estirpes são boas formadoras de biofilme ou não (MELO et al., 2012).

Com relação ao teste de eficácia aos desinfetantes, utilizados no pré e pós-dipping, o perfil de sensibilidade *“in vitro”* dos *Staphylococcus* coagulase positivo frente à clorexidine, nos tempos de 15”, 30” e 60” foi de 79,73% (118/148), 80,41% (119/148) e 83,78% (124/148), respectivamente. Quanto ao iodo, observou-se que os isolados apresentaram 59,46% (88/148), 65,54% (97/148) e 66,22% (98/148) de sensibilidade respectivamente. Já para a alantoína, os isolados apresentaram 22,30% (33/148), 27,03% (40/148) e 37,74% (56/148) de sensibilidade nos mesmos tempos. Com relação ao ácido láctico, observou-se que 18,92% (28/148), 20,95% (31/148) e 22,30% (33/148) das amostras foram sensíveis em 15”, 30” e 60”. Ainda com relação ao cloro, observou-se que 12,6% (18/148), 15,58% (23/148) e 17,57% (26/148) dos isolados foram sensíveis nos tempos estudados (Figura 4).

Figura 4. Perfil de sensibilidade *“in vitro”* dos desinfetantes utilizados no *pré* e *pós dipping* em propriedades leiteiras frente à *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite bovino da Região da Bacia Leiteira de Alagoas, 2016.



(PEIXOTO, 2016)

Os resultados obtidos neste estudo indicaram maior atividade desinfetante *“in vitro”* do clorexidine (83,78%). Em estudo semelhante, Medeiros et al. (2009), ao

avaliarem a eficácia” *in vitro*” de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina das regiões Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco, encontraram 93,3% de sensibilidade ao clorexidine, para *Staphylococcus aureus*; e 72,7% para SCP, sendo também um dos desinfetantes com maior sensibilidade para essas espécies no referido estudo. Em contrapartida, em estudo realizado por Ramalho et al. (2012), avaliando a eficácia “*in vitro*” de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping*, frente a *Staphylococcus* spp. isolados do leite de vacas procedentes de propriedades leiteiras do Agreste e Zona da Mata do Estado de Alagoas, o clorexidine apresentou resistência de 100% aos SCP, porém apresentou ação desinfetante de 87,5% para *Staphylococcus aureus* e 91,9% para SCN.

Embora o clorexidine tenha se apresentado como o desinfetante com maior sensibilidade frente à *Staphylococcus* coagulase positiva, neste estudo, sua utilização a campo deve ser feita com cautela, pois sua eficácia pode ser diminuída na presença de água dura, clorada ou com excesso de matéria orgânica.

Neste estudo o iodo apresentou ação desinfetante inferior a clorexidine, sendo o segundo desinfetante com melhores resultados, com 66,6% de sensibilidade. Em estudo semelhante realizado por Ramalho et al. (2012), no Estado de Alagoas, o iodo também apresentou ação desinfetante inferior a clorexidine para algumas espécies, sendo observado 56,3% de sensibilidade frente à *Staphylococcus aureus* e 66,2% frente à *Staphylococcus* coagulase negativa. Medeiros et al. (2009), avaliando a eficácia” *in vitro*” de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina no Estado de Pernambuco, encontraram 100% de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* e SCP ao iodo, sendo este o desinfetante que apresentou os melhores resultados no estudo.

O iodo é um dos principais desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*, sendo o principio ativo encontrado na maioria das propriedades visitadas, devido a grande disponibilidade do produto no mercado, a rotina e facilidade de uso e de visualização após a aplicação.

A sensibilidade de *Staphylococcus* coagulase positiva a alantoína observada neste estudo foi de 37,84%, sendo considerada intermediária quando comparada aos perfis de sensibilidade aos demais desinfetantes avaliados. Como trata-se de

um composto que começou a ser utilizado mais recentemente, nos processos de higienização na ordenha, se faz necessária a realização de mais estudos como este para avaliar efetivamente a eficácia do mesmo. Vale salientar que, até o momento, não existem outros estudos avaliando a sensibilidade de microrganismos causadores de mastite frente a esse princípio ativo.

A sensibilidade de *Staphylococcus* coagulase positiva frente o ácido láctico, foi de 22,30%. Melhores resultados foram obtidos por Medeiros et al. (2009), estudando a eficácia "in vitro" de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina das regiões Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco, onde observaram que o ácido láctico foi um dos desinfetantes com maior sensibilidade para SCP no referido estudo, apresentando melhor eficácia com 100% de sensibilidade, além disso, 53,30% dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram sensíveis a este princípio ativo. Esses resultados divergem do observado neste estudo, onde este desinfetante foi um dos que apresentou menor perfil de sensibilidade.

Nesse estudo os resultados mais baixos de sensibilidade observados, dentre os desinfetantes utilizados, foram em relação ao cloro, pois a maioria dos isolados mostrou-se resistente nos diferentes tempos de análise, com 17,57% de sensibilidade. Este resultado pode estar associado a práticas de uso inadequado deste produto nas propriedades estudadas, como falhas na diluição, que podem resultar em uma concentração de uso inferior a recomendada pelo fabricante, baixa qualidade da água utilizada e elevado tempo entre o preparo e o uso da solução.

Medeiros et al. (2009), estudando a eficácia "in vitro" de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina das regiões Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco, observaram que 100,0% dos isolados de SCP foram resistentes ao cloro em todos os tempos estudados, e desaconselharam a utilização deste princípio ativo nas práticas de pré e pós *dipping* nas propriedades das regiões estudadas.

Ramalho et al. (2012), avaliando a eficácia "in vitro" de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós *dipping*, frente a *Staphylococcus* spp. isolados do leite de vacas procedentes de propriedades leiteiras do Agreste e Zona da Mata do Estado de Alagoas, encontraram resultados satisfatórios para o cloro nos diferentes

tempos estudados, diferindo dos resultados observados neste estudo. Os perfis de sensibilidade observados foram de 70,3% para espécies SCN, 68,8% para *S. aureus* e 57,1 para SCP.

O uso do cloro como agente desinfetante é prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo, entretanto, tem como desvantagem sua menor estabilidade, além da não observação das recomendações e critérios de uso pelos produtores (AMARAL et al., 2004).

Percebe-se que a eficácia dos produtos avaliados varia muito entre os estudos, esse fato se deve não somente as espécies de microrganismos, mas também a sua possível resistência aos princípios ativos dos produtos. Este fato ressalta a importância e necessidade de se avaliar constantemente a sensibilidade dos produtos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras.

Pôde-se observar, ainda com os resultados deste estudo, que a ação da clorexidine, iodo, alantoína, ácido láctico e cloro, foram maiores quanto maior o tempo de exposição, o que ressalta a necessidade e importância de se respeitar o tempo mínimo de ação recomendado para os desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*. Pois de acordo com Bessems (1998), a concentração e o tempo de contato são fatores que podem interferir na ação do desinfetante. Foi observado que na maioria das propriedades visitadas, que o tempo de atuação dos desinfetantes não era respeitado, o desinfetante era aplicado e imediatamente era realizada a secagem dos tetos com papel toalha. Além disso, na maioria dos animais a imersão dos tetos na solução desinfetante não era realizada de maneira correta e não cobria os dois terços do teto como é recomendado.

O processo de infecção da glândula mamária, por microrganismos de origem contagiosa, tais como espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, ocorre via ascendente pelo canal do teto e, tendo em vista, o potencial dos mesmos se aderir e formarem biofilmes permanecendo nos alvéolos, tornando-se fontes de infecção e contaminação constantes, evidencia-se a importância da realização da correta antissepsia dos tetos, por meio da utilização do pré e pós *dipping* na prevenção e controle da mastite (MELO et al., 2012). Além disso, é necessária a avaliação periódica dos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras, pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina (MEDEIROS et al., 2009).

5 CONCLUSÕES

A maioria dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo do leite bovino provenientes de quartos mamários com mastite subclínica foi capaz de produzir biofilmes, habilidade esta associada ao potencial dos microrganismos causarem infecções persistentes e de difícil tratamento e suspeita de ser uma condição através da qual os isolados escapam do sistema imunológico, conseguindo se manter no interior da glândula mamária.

A melhor atividade desinfetante “*in vitro*” frente à *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados de casos de mastite subclínica, foi observada para clorexidina e iodo, e quanto maior o tempo de exposição dos isolados aos sanitizantes melhor a sensibilidade apresentada. Contudo se faz necessária a avaliação periódica da eficácia dos desinfetantes utilizados, antes e após a ordenha nas propriedades leiteiras da região estudada.

6 IMPLICAÇÕES

Sugere-se então, a avaliação da capacidade de formação de biofilmes também para outros agentes etiológicos da mastite, além de buscar conhecer as condições que favorecem sua formação, a fim de implantar medidas de controle mais eficazes e econômicas, para se obter um leite de melhor qualidade.

Os padrões de sensibilidade podem ser facilmente alterados devido à rotina e condições inadequadas de uso, dessa forma ressalta-se a importância da avaliação periódica da eficácia dos desinfetantes utilizados, antes e após a ordenha nas propriedades leiteiras da região estudada.

Além disso, se faz necessário avaliar a eficácia desses produtos sobre o biofilme consolidado, uma vez que os microrganismos nessa condição são considerados mais resistentes.

REFERÊNCIAS

- AMARAL L.A. ; et al. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesq. Vet. Bras.** 24(4):173-177. 2004.
- ANDRADE, S. F. et al. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: ROCA. 2ª Ed. 2006. 720 p.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **ARS Veterinária**. v. 25; n. 3; p. 129- 135, 2009.
- ANTUNES L.C. et al. Quorum sensing in bacterial virulence. **Microbiology**;156(Pt 8):2271-82. 2010.
- APARNA, M.S.; SARITA, Y. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.6, p.526-530, 2008.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaa* and *icad* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. **Journal of clinical microbiology**, v.39, p.2151-2156, 2001.
- BANCO DO NORDESTE DO BRASIL (BNB). **Perfil dos Estados – Alagoas: Polo de Desenvolvimento Integrado – Bacia Leiteira de Alagoas**. 2005. Disponível em: . Acesso em: 20 mar. 2016.
- BANDEIRA, F.S. et al. Frequency of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases, in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.1-6, 2013.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive coccigrow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p.384-404, 2003.

BARBALHO, T.C.F. MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclinica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.2, 2001

BESSEMS E. The effect of practical condition on the efficacy of disinfectants. *Int. Biodeter. Biodegr.* 41(3/4):177-183. 1998.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 29(4): 886-895, Out.- Dez. 2009.

BODDIE, R. L., NICKERSON, S. C. e ADKINSON, R. W. Efficacies of Chlorine Dioxide and Iodophor Teat Dips During Experimental Challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Dairy Science**, Vol 83, 2975–2979, 2000.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro, Dezembro de 2016a. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>. Acesso em 15 de Dez de 2016.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro, Dezembro de 2016b. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201603caderno.pdf. Acesso em 15 de Dez de 2016.

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.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Mastite bovina**. São Paulo: Manole, 2000, 114-129p.

BRITO, M.A.V.P; et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.2, p.33-35, abr. 1999.

BUITENHUIS, B.; et al. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine Escherichia coli-mastitis. **BioMedCentral Genomics**, v.12, 2011.

BUSSAB, W.O.; MARETTIN, P.A. **Estatística básica**. 5ª ed. São Paulo: Saraiva, 2004. 120p.

CAIXETA, D. S. **Sanitizantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 80p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2008.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARTER G.R.. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. Roca, São Paulo. 250p. 1998.

CORREA, C. P.A; RIBAS M. M. F.; MADRONA G. S. Avaliação das condições higiênico sanitárias do leite cru em pequenas propriedades do município de Bom Sucesso- PR. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 03, n 02, p. 21-28, 2009.

COSTA E.O., et al. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós-ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina. **Revta Nappama** 1(1):18-22. 1998.

COSTA, G. M. da et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1938-1942, out, 2008.

COSTERTON, J.W. et al. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, n.5418, p.1318-1322, 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.9, p.2888-2896, 2001.

DANTAS, J. S. **Palestra proferida na abertura do Congresso Internacional do Leite**, 10. 2011, Maceió: Centro de Convenções, 26 out. 2011.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**, Mossoró, v.1, n.1, p.23-27, 2007. Disponível em: <<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/viewFile/255/95>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

DIEDRICH, C. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Alim. Nutr.=Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296. 2013.

DURR, W. J. **Como produzir leite de alta qualidade**. Brasília: Senar, 2012. 28 p.

EMBRAPA – Gado de Leite. 2016. **Introdução e importância econômica**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/31-introdu%C3%A7%C3%A3o-e-import%C3%A2ncia-econ%C3%B4mica>. Acesso em 15 de fev de 2017.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 23 de agosto. 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Milk and Milk Products**. 2016b. Disponível em: Acesso em: 24 set. 2016.

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, 2000.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da mastite**. 1 ed. São Paulo: Lemos editorial, 2000. 175p.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

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

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

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

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. 264p.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças dos ruminantes e equinos**. Santa Maria: Palloti, 2007. v.1, p.359-371.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.3, p.57-64, 2000.

LOPES et al;. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.4, p. 477-483. Out/dez 2012.

MASSEI, R.A.; SANTOS, W.R.M.; INFORZATO, G.R. Mastite – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, 2008.

MEDEIROS E.S., et al. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** 29(1):71-75. 2009.

MEIRA, Q. G. S. **Capacidade de adesão, formação de biofilme e resistência a sanitizantes de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de serviços de alimentação.** 110p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 2011.

MELO, P. de C., et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. 2012. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99.

MELO. P. de C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina.** 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. 2008.

MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária notícias**, v.5, n.1, p.17-118, 1999.

MERINO N., et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol** 191(3):832-843, 2009.

MONROE, D. **Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms.** PLoS Biol, 5(11):2458-2461, 2007.

MORÃO et al. Produtos Convencionais e extratos de plantas medicinais utilizados na higienização de tetos de bovinos leiteiros. **Caderno de Ciências Agrárias.** V. 7, n.1, Jan./abr. Suplemento 1. 2015.

MORINI. R. M. **MANEJO CONSULTORIA AGROPECUÁRIA: Qualidade do leite e manejo de ordenha.** 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, GO. 2009.

MOTA, R. A. et al. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.13, n.1, p. 124-130, jan./mar. 2012

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p.57-61, 2008.

NADELL, C.D.; XAVIER, J.B.; LEVIN, S.A. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**; 6(1):171-9, 2009.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Recommended protocols for evaluating efficacy of postmilking teat germicides**. Annual meeting proceedings, 2004. p. 179-399, 2004.

NAVES, P., et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb Path**, 45:86-91, 2008.

NOEL, C. C., et al. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp*. Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. **Revista de Saúde**. 2016 Jan./Jun.; 07 (1): 22-26, 2016.

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

O' TOOLE, G. et al. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews os Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.

OLIVEIRA, C. M. C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 104-110, 2011.

OLIVEIRA, N. **Mastite Bovina: Controle e Prevenção**. Boletim Técnico. Boletim Técnico - n.º 93 - p. 1-30 ano 2012, Lavras/MG .

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

PASSOS, T. **Desinfecção de tetos pré e pós ordenha** – implicações sobre produtos e seu manuseio. Disponível em: <http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=701>. Acesso em 03 de fev de 2017.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S. C. **Wining the fight Against Mastitis**. Westfalia Surge Inc. 1880 Country Farm Drive, Naperville, 2000.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p

PINTO P, A. A. et al. PERFIL Microbiológico do leite bovino produzido na bacia leiteira de alagoas quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positivo. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, p. 191-197, 2011.

PYORALA S.; TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.3-8, 2009.

QUINN, P.J. et al. trad. Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 453-460p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMALHO, A. C., et al. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras. [online]**. 2012, vol.32, n.12, pp.1285-1288.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

SAEKI, E. K., et al. Mastite bovina por *staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

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

SANTANA, E.H.W. et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, L.L.; PEDROSO, T.F.F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.860-866, 2010.

SANTOS, M. V e FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle de mastites e melhoria da qualidade do leite**. Manole, Barueri/SP. p. 47-64, 2007.

SANTOS, M. V.; TOMAZI, T.. Mastite contagiosa ou ambiental: Um diagnóstico em nível de rebanho. **Revista Leite Integral**, Piracicaba, SP, p. 30 - 34, 01 out. 2012.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de Biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista– Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. 2009.

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

SEAGRI - ALAGOAS – 2016. **Cadeia do Leite de Alagoas se consolida como a mais competitiva do Nordeste**. Disponível em <<http://www.agricultura.al.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/2016/janeiro/cadeia-do-leite-de-alagoas-se-consolida-como-a-mais-competitiva-do-nordeste>>. Acesso em 15 de fev de 2017.

SIMOJOKI, H., et al. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection. **Vet Microbiol.** 2012 Aug 17;158(3-4):344-52, 2012.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(1): 41-45, jan.-mar. 2006.

STEPANOVIC S., et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microb Meth** 40(2):175–179, 2000.

STEPANOVIC, S., et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella spp.* **Food Microbiology**. V. 20, Issue 3, p.339–343, 2003.

STOODLEY, P., et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, 56:187-209, 2002.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L; **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920p.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, 2008.

TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios**. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros” – Unidade de São Paulo. Piracicaba, SP.2010.

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.

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

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

YAMAZI, A.K., et al. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Biosciência J.**, v. 26; n. 4; p. 610- 618, 2010.

ZAFALON, L.F., et al. **Boas práticas de ordenha**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. Disponível em:
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/876545/1/documentos78.pdf>>.
Acesso em: 26 jul. 2012.

ZOCCAL, R. **Alguns números do leite**. Disponível em;
<http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/>. Acesso em 15 de fev de 2017.