

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Dissertação

**Identificação e perfil de resistência de cocos gram-positivos isolados de
ordenhadeiras no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Pedro Rassier dos Santos

Pelotas, 2020

Pedro Rassier dos Santos

**Isolamento, identificação e perfil de resistência de cocos gram-positivos
isolados de salas de ordenha no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia e Parasitologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas (área do conhecimento:
Microbiologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Giniani Carla Dors

Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima

Pelotas, 2020

Pedro Rassier dos Santos

Identificação e perfil de resistência de cocos gram-positivos isolados de ordenhadeiras no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Patrícia da Silva Nascente. Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (orientadora).

Prof^a Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig. Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Carolina Lambrecht Gonçalves. Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Luiza da Gama Osório. Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima. Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (suplente).

Resumo

SANTOS, Pedro Rassier. **Identificação e perfil de resistência de cocos gram-positivos isolados de ordenhadeiras no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2020. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O leite é um alimento de alto valor nutritivo que auxilia no desenvolvimento e crescimento humano, entretanto, ele também pode abrigar microorganismos que alteram sua composição e produzem enzimas e toxinas como parte do seu metabolismo. Muitos destes microorganismos são resistentes a antibióticos e a agentes desinfetantes utilizados na indústria, salientando assim, a importância dos cuidados que vão desde a obtenção até a estocagem do leite. Por conta disso, o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar o perfil de resistência e fatores de patogenicidade de cocos gram-positivos isolados de teteiras em salas de ordenha no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas com *swabs* de teteiras, em oito propriedades e a identificação foi realizada através de provas bioquímicas e moleculares, sendo isoladas 17 bactérias identificadas como: *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1) e *Streptococcus dysgalactiae* (1). A partir das identificações, foi realizado o antibiograma com a avaliação de 13 antibióticos, e o gênero que apresentou maior resistência foi o *Enterococcus*, com isolados resistentes a Levofloxacina, Cefoxitina, Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Imipenem, Meropenem, Oxacilina, Clindamicina e Rifampicina. Além disso, todos os 17 isolados foram capazes de formar biofilme, que permaneceu viável após a utilização de detergente neutro, alcalino e alcalino-clorado. O único produto que inibiu o biofilme de todos os microorganismos foi a clorexidina 2%. Os resultados obtidos neste trabalho salientam para a importância dos testes de *pré* e *pós-dipping* nas propriedades leiteiras, onde a clorexidina é um dos desinfetantes utilizados, já que pelo observado, os detergentes ácido, alcalino-clorado e neutro, indicados para limpeza e desencrustação de tubulações, não se mostraram eficazes sob biofilmes das diferentes espécies testadas.

Palavras-chave: produção leiteira; contaminação alimentar; biofilme; mastite; clorexidina.

Abstract

SANTOS, Pedro Rassier. **Identificação e perfil de resistência de cocos gram-positivos isolados de ordenhadeiras no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2020. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Milk is a high nutritional value food that helps in human development and growth, however, it can also harbor micro-organisms that alter its composition and produce enzymes and toxins as part of its metabolism. Many of these micro-organisms are resistant to antibiotics and disinfectants used in the industry, thus highlighting the importance of care ranging from obtaining to storing milk. Therefore, the objective of this work was to isolate, identify and evaluate the resistance profile and pathogenicity factors of gram-positive cocci isolated from liners in milking rooms in the south of Rio Grande do Sul, Brazil. Collections were performed with swabs from initial liners and the identification was performed through biochemical and molecular tests. Seventeen bacteria were isolated, identified as *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1) and *Streptococcus dysgalactiae* (1). After the identifications, the antibiogram was performed with the evaluation of 13 antibiotics. The genus that proved to be resistant to most of these was the *Enterococcus*. In addition, all 17 isolates were able to form biofilm, which remained viable after the use of neutral, alkaline and alkaline-chlorinated detergent. The only product that was effective against biofilm of all micro-organisms was chlorhexidine 2%. The results obtained in this work highlight the importance of pre- and post-dipping tests on dairy properties, in which chlorhexidine is one of the disinfectants used, since, as observed, products indicated for cleaning and descaling pipes were not effective on biofilms of the different species tested.

Keywords: dairy production; food contamination; biofilm; mastitis; chlorhexidine.

Lista de Figuras

Figura 1 Etapas de formação de biofilme Fonte: CAPELLETTI, 2006.....	16
Figura 2 Produção de biofilme de acordo com cada bactéria. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	29
Figura 3 Formação de biofilme no grupo controle (ATCC 25904), onde a figura A representa o biofilme formado nas mangueiras de sala de ordenha na hora 0, B em 24 horas, C nas 48 horas e D nas 72 horas.	30
Figura 4. Biofilme formado <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 25904™) após 72 horas em contato com o meio de cultivo <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI).	31
Figura 5 Biofilme formado após 72 horas das mangueiras em contato com inóculo e meio de cultivo, onde (a) <i>Enterococcus faecalis</i> (b) <i>Streptococcus uberis</i> (c) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25904).	32
Figura 6 Biofilme formado por <i>Streptococcus uberis</i> , onde é possível observar as diferentes composições de sua estrutura.	32
Figura 7 Produção de biofilme com os diferentes tratamento, onde 1 corresponde ao controle sem ação de produto, (2) detergente neutro, (3) clorexidina, (4) detergente ácido, (5) detergente alcalino-clorado, (6) detergente alcalino-clorado a 45°C, (7) H ₂ O a 45°C.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequência de pares de bases utilizados para a identificação molecular dos isolados bacterianos.....	23
Tabela 2 Perfil de sensibilidade das bactérias frente aos antibióticos testados.....	28

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	7
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Produção Leiteira	10
2.2 Manejo na Ordenha	11
2.3 Cocos Gram-positivos	12
2.4 Resistência Bacteriana	15
2.5 Biofilme	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MANUSCRITO	19
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	456

1 INTRODUÇÃO GERAL

O leite e seus derivados desempenham um papel nutricional importante para o desenvolvimento humano, fornecendo proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais (BITENCOURT et al., 2000). Entretanto, ele também pode servir como meio para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, patógenos e deteriorantes, havendo assim, a necessidade de cuidados desde a sua produção até sua estocagem (TEUBER, 1992). De acordo com Santos (2007), a ordenha pode ser considerada uma das tarefas mais importantes dentro da propriedade leiteira, porque para se obter um produto de alta qualidade, são necessários diversos cuidados e manejos de ordenha adequados para reduzir a contaminação microbiana, física e química do leite. Quanto maior o número de contaminantes e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do produto (SILVEIRA; CARVALHO & TEIXEIRA, 1998).

No Brasil, a pecuária leiteira é considerada uma das atividades mais importantes do setor agropecuário, trazendo grande relevância social e econômica para o país (LUCCA & AREND, 2020). Entretanto, tem se observado alguns problemas no setor, como problemas de qualidade do leite encontrado no Rio Grande do Sul, que apresenta altas contagens de micro-organismos, muitas vezes relacionados a falta de higiene na obtenção do mesmo (REIS et al., 2017). Essa falta de higiene no processo de ordenha pode acarretar na presença de bactérias no leite e ocorrência de doenças em humanos que o consumirem (CERVA, 2013). No país, a microbiota predominante no leite cru geralmente inclui espécies de bactérias ácido lácticas como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp., além de *Pseudomonas* spp., e bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae*, como *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (TEBALDI et al., 2008; PINTO et al., 2015).

Uma alternativa para minimizar os riscos de contaminação microbiana dentro da bovinocultura leiteira é a aplicação de Boas Práticas de Produção (BPP) nas diferentes etapas do processo (VALLIN et al., 2009). Paschoal (2014) salienta que os equipamentos que auxiliam na ordenha podem contribuir com cerca de 10 % da carga microbiana do leite em condições experimentais, podendo este valor aumentar

caso a estrutura ou a limpeza dos equipamentos não estejam satisfatórias. Com relação aos equipamentos dentro da sala de ordenha, Gleeson et al. (2009) destacam as teteiras da ordenhadeira mecânica como a maior causa de contaminação entre as vacas, entretanto, o adequado manejo pré-ordenha pode reduzir a contaminação dos tetos não só por bactérias ambientais como também por bactérias provenientes de outros animais.

A melhor forma de preparar o teto para a ordenha é realizando o *pré-dipping*, que significa a imersão dos tetos das vacas em uma solução desinfetante momentos antes da ordenha, responsável por queda de até 50% na taxa de novas infecções da glândula mamária e conseqüentemente, diminuição do número de bactérias que entram em contato com o leite e passam pelas tubulações (FONSECA & SANTOS, 2001; BLOWEY; EDMONDSON, 2010). Entretanto, a desinfecção ao final da ordenha (*pós-dipping*) é considerada a prática isolada mais importante de controle de novas infecções intramamárias, onde os melhores resultados estão relacionados ao uso de iodo, 0,7% a 1,0%; clorexidina, 0,5% a 1,0% e cloro, 0,3% a 0,5% (FONSECA & SANTOS, 2001).

Dentre as diversas doenças que podem ocorrer dentro do rebanho leiteiro, comprometendo a qualidade do leite, destaca-se a mastite, por ser considerada um problema de saúde pública de grande perda econômica e difícil controle (PYÖRÄLÄ, 2002). A mastite é uma inflamação da glândula mamária que pode ser causada por injúria química, mecânica ou infecção microbológica, sendo esta última a mais comum (FONSECA; SANTOS, 2001). A Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que a prevalência da mastite está relacionada, principalmente, ao manejo antes, durante e após a ordenha, salientando a importância da conscientização do ordenhador e da realização dos métodos adequados de ordenha, incluindo a correta antissepsia do animal e profissional e desinfecção do ambiente e de todos os utensílios utilizados na ordenha (BRASIL, 2018).

Além disso, devido à possibilidade das células bacterianas apresentarem variações no perfil de suscetibilidade, torna-se necessária uma avaliação periódica sobre a eficácia dos desinfetantes nas propriedades leiteiras, para que os programas de controle da mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. e outros cocos

gram-positivos não percam a efetividade (MEDEIROS et al., 2009). Estudos que tratam da suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus* (CARVALHO et al., 2018; NOEL et al., 2016). A maior causa relacionada ao aumento dessa resistência é o uso incorreto e indiscriminado de antibióticos (DA COSTA et al., 2013).

Entre os fatores de resistência, destaca-se a formação de biofilme. Os biofilmes são constituídos de bactérias envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, as quais se aderem a qualquer superfície, formando uma espécie de crosta composta por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Nesses locais, os micro-organismos continuam a se multiplicar e estão mais resistentes aos procedimentos de higienização por agentes físicos e químicos (COSTERTON et al., 1999). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as bactérias nos biofilmes tornam-se mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos, quando comparadas com as células livres das mesmas estirpes(QI et al., 2016; GURUNG et al., 2013; NEUPANE et al., 2016).

Sabendo disso, as mangueiras de teteiras da sala de ordenha, quando mal higienizadas, podem servir como abrigo para a proliferação de micro-organismos, e estes podem apresentar capacidade de formação de biofilme, tornado assim, importante a avaliação da eficácia da clorexidina, utilizada para a antissepsia do teto no *pré* e *pós-dipping*, além dos detergentes neutro, alcalino-clorado e ácido, utilizados para a desinfecção dos equipamentos da sala de ordenha.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção Leiteira

Cerca de 150 milhões de lares em todo o mundo estão envolvidos na produção leiteira, pois a atividade apresenta um retorno rápido aos pequenos produtores (FAO, 2016). No Brasil, a produção leiteira cresce a uma taxa relativamente constante desde 1974. De 1974 a 2014, a produção nacional quase quadruplicou, passando de 7,1 bilhões para mais de 35,1 bilhões de litros de leite (MAIA et al., 2013). Entretanto, a partir de 2015, a produção caiu por dois anos consecutivos, fato até então inédito desde o início da série histórica publicada pelo IBGE. Em 2017, o Brasil voltou a registrar crescimento na produção de leite, superando o período de queda anteriormente observado, alcançando 33,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2019).

Em 2017 o país ocupou a segunda posição mundial em rebanho, com o efetivo igual a 214,9 milhões de bovinos. No mesmo ano, a região sul apresentou a maior produção leiteira, com 35,7% da produção nacional, sendo que o Estado do Rio Grande do Sul (RS) ficou em segundo lugar neste mesmo *ranking*, perdendo apenas para Minas Gerais (IBGE, 2017). Com relação à quantidade de leite adquirido pelos laticínios brasileiros, houve um aumento nacional de 181,85 milhões de litros de leite no primeiro trimestre de 2019, quando comparado ao mesmo período de 2018.

Embora tenha ocorrido aumento nacional na produção, o Rio Grande do Sul apresentou uma queda significativa (-10,24 milhões de litros), assim como Rio de Janeiro (-17,67 milhões de litros) e São Paulo (-15,58 milhões de litros). Os aumentos mais relevantes, em valores absolutos, ocorreram em Goiás (+76,61 milhões de litros), Paraná (+43,71 milhões de litros), Minas Gerais (+42,80 milhões de litros) e Ceará (+13,75 milhões de litros) (IBGE, 2019). Embora tenha ocorrido queda na quantidade de leite adquirido no Rio Grande do Sul, o Estado continua bem colocado no *ranking* nacional, representando 13,1% da produção nacional adquirida, perdendo apenas para Minas Gerais com 25,3% (IBGE, 2019).

2.2 Manejo na Ordenha

O leite coletado no Brasil tem apresentado alguns problemas na sua qualidade, como a alta contagem de micro-organismos (CARVALHO et al., 2018; NOEL et al., 2016). Fatores físicos ou químicos, tais como solo; água; elementos químicos usados na higienização de tetos e de equipamentos; fatores climáticos e componentes biológicos, estão comumente relacionados a baixa qualidade de leite obtido em todo o Brasil (ZAFALON et al., 2009). Entre as principais causas, estão as inadequadas condições de higiene de ordenha e procedimentos inadequados de limpeza de utensílios e equipamentos (NERO et al., 2009).

O uso dos desinfetantes na limpeza das salas de ordenha tem grande importância na aplicação das boas práticas de produção e no lucro da propriedade, contribuindo para a produção de alimentos lácteos de qualidade e para a obtenção de um rebanho sadio (FONSECA & SANTOS 2001). Com isso, o processo de sanitização visa eliminar a maior parte dos micro-organismos existentes nos equipamentos que entram em contato com o leite, enquanto que o processo de higienização tem como objetivo principal a eliminação de resíduos orgânicos e inorgânicos do leite que favorecem o desenvolvimento desses micro-organismos (HOFFMANN et al., 2002).

Muitos agentes químicos possuem atividade frente aos micro-organismos, inativando-os em instalações e equipamentos. Estes podem ser ácidos, alcalis, álcoois, aldeídos, halogênios, fenóis e agentes quaternários de amônia (QUINN et al., 2005). De acordo com Santos (2007) o tempo de ação, a temperatura, o volume, a concentração dos detergentes e a drenagem adequada são os fatores que mais influenciam na eficiência de limpeza dos equipamentos de ordenha. Na maioria das propriedades, os produtos são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço, não sendo avaliada a sua ação, o que acaba levando a uma seleção natural de cepas resistentes (PEDRINI & MARGATHO, 2003).

Cerva (2013) recomenda que a ordenhadeira seja limpa e desinfetada após cada ordenha, observando os seguintes passos: enxágue do equipamento interno e externo com água morna para retirar os resíduos de leite; limpeza da ordenhadeira com escova e detergente alcalino-clorado diluído em água quente, conforme instruções do fabricante, deixando de molho na solução por 10 minutos; desinfecção do equipamento, deixando mergulhada a ordenhadeira durante 5 minutos em uma

solução clorada (misturar uma parte de água sanitária com nove partes de água) e deixar escorrer bem a água residual, secando o equipamento antes do próximo uso. E, pelo menos uma vez por semana, limpar a ordenhadeira com escova ou esponja limpa e detergente ácido diluído em água fria, deixando de molho nesta solução por 5 minutos, conforme instruções do fabricante.

Devido à possibilidade das células bacterianas apresentarem variações no perfil de suscetibilidade (QUINN et al., 2005), torna-se necessária uma avaliação periódica sobre a eficácia dos produtos utilizados nas propriedades leiteiras, para que os programas de controle da mastite bovina causada por micro-organismos não percam a efetividade (MEDEIROS et al., 2009). De acordo com Costa et al. (1998), a presença de matéria orgânica está relacionada com a redução da ação dos desinfetantes no controle da mastite. Por isso, salienta-se a importância da desinfecção correta de todos os equipamentos dentro da sala de ordenha e a avaliação periódica da eficácia dos produtos utilizados, visto que as despesas com tratamento preventivo, representaram, no máximo, 9,2% do impacto econômico gerado pela mastite (DEMEU, F. A. et al., 2011).

2.3 Cocos gram-positivos

Cocos gram-positivos estão entre a microbiota predominante no leite cru, além de serem comumente encontradas no úbere, pele dos animais e equipamentos utilizados na ordenha (MELDAU, 2005). Dentre os gêneros que predominam, incluem-se *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (LAFARGE et al., 2004; MELDAU, 2005).

O gênero *Staphylococcus* é composto por micro-organismos com aproximadamente 1µm de diâmetro, com tendência a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uvas (QUINN et al., 2005). A maioria das espécies é anaeróbia facultativa e catalase positiva, além de serem imóveis, oxidase negativa e não formadores de esporos. *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius* são importantes patógenos de animais domésticos (QUINN et al., 2005).

Quando se fala de mastite, *S. aureus* é o principal agente etiológico, sendo isolado em diferentes países no mundo, incluindo o Brasil (ETIFU & TILAHUN, 2019; GEMECHU; YUNUS; SOMA & BEYENE, 2019; MESQUITA et al., 2020). Sua eficiência como agente causador de doenças se deve a capacidade de se adaptar a condições hostis, o que facilita sua colonização e dispersão. Além disso, apresentam

diversos fatores de virulência, como proteína A, enzima e toxinas que contribuem para o estabelecimento da infecção (CEPEDA et al., 2005). Esta espécie apresenta capacidade para formação de biofilme e sua infecção apresenta-se na forma subclínica, resultando em vacas contaminadas, aumento de células somáticas e difícil erradicação (BRITO; BRITO, 1998).

Fossas nasais, mãos e braços de manipuladores de alimentos abrigam *S. aureus* e servem como fontes de contaminação para os alimentos (JAY, 2005). Embora não resistam ao calor, sendo destruídos por pasteurização, suas toxinas permanecem viáveis, suportando até mesmo esterilização de alimentos e baixa acidez (SILVA; JUNQUEIRA & SILVEIRA, 1997). Quando comparado com *S. aureus*, *S. intermedius* é isolado com menor frequência de casos de mastite bovina (CUNHA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011).

Streptococcus são catalase-negativa e anaeróbios facultativos, assim como *Enterococcus* (QUINN et al, 2005). Dentro do gênero *Streptococcus*, *Streptococcus uberis* é um patógeno importante na indústria de laticínios (ZADOKS, et al., 2003), visto que é um dos principais agentes causadores da mastite no mundo (Wald et al., 2020). São predominantemente encontrados na glândula mamária de vacas que não estão no período de lactação, relacionados principalmente a mastite ambiental, sem sinais visíveis, embora haja muitos casos de mastite clínica causada por este micro-organismos (LÄMMLER, HAHN, 1994).

Além de *S. uberis* serem encontrados nos animais, são também encontrados em estrume, pasto e materiais de cama, com concentrações altas em palha, moderadas em serragem e baixas em maravalha e material inorgânico (areia, por exemplo). São considerados micro-organismos de fácil colonização, visto que resistem a fagocitose pelos neutrófilos e adquirem os nutrientes do leite. Como características clínicas alteram o leite, possuindo poucos relatos de doenças sistêmicas (10% das vacas afetadas) (QUINN et al., 2005). Além desta espécie, *Streptococcus dysgalactiae* também está entre os mais comuns micro-organismos relacionados a mastites ambientais, que tem como principal reservatório o ambiente onde a vaca vive, não limitando-se apenas a locais onde é realizada a ordenha (SMITH & HOGAN, 1993; SMITH et al., 1985; OLIVER, 1988; TODHUNTER, SMITH & HOGAN, 1995). Embora sejam isolados a partir de tonsilas, boca e vagina de vacas, podem persistir nas glândulas mamárias e ser transmitidos de uma vaca para outra (QUINN et al., 2005).

O gênero *Enterococcus* é composto de cocos gram-positivos que ocorrem isoladamente, mas que também podem ser encontrados em pares ou cadeias curtas. Amplamente distribuídos, podem ser encontrados na natureza, trato intestinal de animais e humanos, laticínios e outros alimentos. São anaeróbios facultativos, não possuem a enzima catalase, e como resultado de seu metabolismo fermentativo produzem ácido láctico a partir de glicose (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2013).

Semelhantes aos *Streptococcus*, *Enterococcus* pertenciam a este gênero, diferindo apenas por apresentarem maior resistência a agentes químicos e físicos. Outra característica importante na diferenciação dos dois gêneros é a capacidade que os *Enterococcus* têm de sobreviverem a sais biliares, enquanto *Streptococcus* não resistem (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007). Embora possuam essas particularidades, a diferenciação exata só foi possível após a introdução de métodos moleculares, reconhecendo assim, *Enterococcus* como um gênero a parte (SCHLEIFER, KILPPER-BALZ, 1984). As primeiras espécies transferidas para o novo gênero foram *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, que passaram a ser *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, respectivamente (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007).

Este grupo de bactérias possui características que permitem a adaptação dos mesmos a uma variedade de condições, o que lhes possibilita serem patógenos comensais e oportunistas. (TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007; FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002). São bactérias comensais que tipicamente colonizam o trato gastrointestinal da maioria dos animais e, eventualmente, colonizam a cavidade oral e trato vaginal (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994). Sua presença em alimentos está relacionada a má condições de higiene na obtenção do mesmo, sob certas circunstâncias causam uma variedade de infecções em humanos, como febre escarlatina, endocardite e infecções do trato respiratório e sistema nervoso (TEBALDI, 2008; MALANI, KRUFFMAN & ZERVOS, 2002).

Enterococcus faecalis é a espécie mais relacionada a amostras clínicas (80-90% dos isolados), seguida por *E. faecium* (5-10%) (MALANI, KRUFFMAN & ZERVOS, 2002; TEIXEIRA, CARVALHO & FACKLAM, 2007). Embora possam causar várias doenças, o que mais chama a atenção é a crescente resistência desses micro-organismos aos agentes antimicrobianos mais utilizados atualmente, sendo, portanto, considerados como um grande desafio terapêutico (SHEPARD & GILMORE, 2002).

2.4 Resistência Bacteriana

O uso de antibióticos ainda é o procedimento mais utilizado dentro das salas de ordenha para o tratamento da mastite bovina, com o intuito de aumentar a produção e reduzir as fontes de infecção (ANDRADE et al., 2000; MOTA et al., 2005). Antibióticos são metabólitos microbianos capazes de matar (bactericida) ou inibir (bacteriostático) o crescimento de bactérias suscetíveis, e seu uso terapêutico depende da toxicidade direta para os animais que recebem o tratamento. Para inibirem o desenvolvimento destas bactérias, devem interagir com estruturas vitais ou bloquear uma rota metabólica (QUINN et al., 2005).

Com a descoberta dos agentes antimicrobianos, surgiu a possibilidade de tratar doenças infecciosas, obtendo-se resultados notórios. Entretanto, observou-se que alguns micro-organismos respondem melhor que outros a agentes antimicrobianos específicos, como por exemplo, a introdução da penicilina, que teve grande sucesso frente aos *Streptococcus* de maneira geral, mas que apresentou menos eficácia a um subconjunto deste grupo, posteriormente conhecido como *Enterococcus*. (WILLIAM et al., 1983).

Andrade et al. (2000) estudaram o comportamento de diferentes agentes isolados da mastite bovina e demonstraram uma situação de alerta pelo uso indiscriminado de antibióticos no tratamento desta enfermidade, visto que nenhum dos antibióticos apresentou 100% de eficácia. Embora a resistência a antimicrobianos possa ocorrer naturalmente por meio de mutações espontâneas, o uso intensivo de antimicrobianos em humanos e animais acelera o processo (WHO, 2015). Entre os mecanismos de resistência estão a produção de enzimas que destroem ou inativam as drogas, redução da permeabilidade celular, criação de rotas secundárias alternativas que substituem as inibidas pela droga, eliminação do antibiótico ou alteração do sitio-alvo da droga (QUINN et al., 2005).

Quando há mutação e uma cepa se torna resistente, o antibiótico elimina apenas as bactérias suscetíveis, fazendo com que haja predominância das bactérias resistentes. Geralmente essas mutações requerem um elevado gasto energético para as bactérias, que diminuem sua aptidão e as mantem apenas durante a exposição ao antibiótico (MUNITA & ARIAS, 2016). O número de bactérias resistentes cresce mais rápido que a capacidade de laboratórios e indústrias criarem

novas drogas, sendo, portanto, necessária a busca por novas alternativas de controle (MOTA et al., 2005).

2.5 Biofilme

Os biofilmes são constituídos de uma matriz polimérica composta de micro-organismos, material polimérico extracelular, que inclui polissacarídeos, proteínas, lipídeos, e resíduos do ambiente colonizado. Se aderem a superfícies sólidas, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada com pequenos canais abertos por entre as microcolônias (CAPELLETTI, 2006; LAWRENCE et al., 1991). Entre todos os micro-organismos, as bactérias são as maiores formadoras de biofilme, embora apresentem aptidões diferentes entre si (CAPELLETTI, 2006).

Uma série de eventos ocorre durante a formação de biofilme, incluindo adesão, colonização (desenvolvimento) e dispersão dos micro-organismos como mostra esquematicamente a Figura 1.

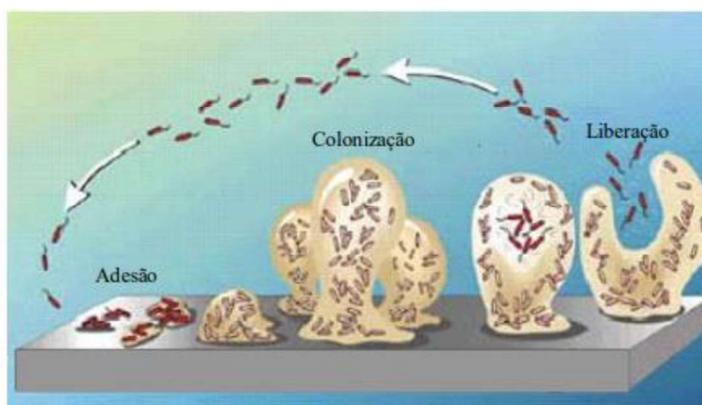


Figura 1 Etapas de formação de biofilme.
Fonte: CAPELLETTI, 2006

O processo inicia com a adesão reversível de bactérias planctônicas, ou seja, que flutuam livres nos fluidos (MARSHAKLL et al., 1971). A adesão é controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos micro-organismos e as macromoléculas que se formam a partir de resíduos do próprio ambiente. Flagelos, fímbrias, pílilis e outros apêndices celulares externos podem contribuir na adesão (CHRISTENSEN & CHARACKLIS, 1990).

Após a adesão inicial com a superfície de contato, ocorrem divisão e crescimento celular. Nesse instante se dá a formação de material extracelular

(biofilme propriamente dito) que mantém as ligações entre as células e de células com a superfície (CAPELLETTI, 2006). A partir de então, a adesão de outros micro-organismos é facilitada e ocorre a liberação de novos colonizadores que se desprendem do biofilme maduro e, posteriormente, podem formar novos biofilmes, caracterizando um ciclo de contaminações (CHRISTENSEN & CHARACKLIS, 1990). Dentro do biofilme, há aumento das populações bacterianas decorrentes de divisões celulares e adesão de novas células planctônicas (FORSYTHE, 2002). Na maioria dos casos, os micro-organismos representam menos de 10% da massa seca e o restante é representado pela matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que pode somar mais de 90% do peso do biofilme (PEREIRA, 2001).

Tubulações industriais e outros circuitos de fluido favorecem o desenvolvimento e formação dos biofilmes, visto que estes são considerados locais de difícil acesso à limpeza (CAPELLETTI, 2006). Além disso, a matriz extracelular presente nos biofilmes dificulta ainda mais a limpeza por funcionar como uma barreira protetora contra fatores externos. Com isso, tem-se um acréscimo de despesas com limpeza, manutenção, substituição precoce de equipamentos, além de problemas no controle de qualidade dos produtos e, conseqüentemente, um problema econômico (CHRISTENSEN & CHARACKLIS, 1990).

Este problema na economia está relacionado a presença dos biofilmes nas plantas de processamentos, que promovem aumento da resistência a agentes de desinfecção e limpeza, favorecendo a contaminação cruzada pós processamento e reduzindo a vida útil do produto (ANAND et al., 2014; BROOKS & FLINT, 2008; KUMAR & ANAND, 1998). Vieira (1995) induziu diversas condições em laboratório e verificou que as circunstâncias podem dificultar o processo de formação do biofilme, mas dificilmente vai ocorrer inibição total. Sendo assim, a intervenção na formação de biofilmes é de grande interesse industrial (BLASCHEK, WANG & AGLE, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e avaliar o perfil de resistência e formação de biofilme de cocos gram-positivos isolados de teteiras em salas de ordenha.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar cocos gram-positivos isolados de teteiras em salas de ordenha no sul do Rio Grande do Sul;
- Verificar o perfil de suscetibilidade dos micro-organismos isolados frente a 13 antibióticos disponíveis no mercado;
- Verificar a capacidade de formação de biofilme dos isolados em material de sala de ordenha;
- Comprovar a formação de biofilme através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Verificar a ação da clorexidina e três detergentes (neutro, ácido, alcalino-clorado) no controle do biofilme maduro, formado pelos cocos gram-positivos nas mangueiras de teteiras.

4 MANUSCRITO

4.1 Manuscrito 1

Identificação, perfil de resistência e produção de biofilme de cocos gram-positivos isolados de propriedades leiteiras no sul do Brasil.

Manuscrito formatado de acordo com a revista *Food Microbiology*

<https://www.journals.elsevier.com/food-microbiology>

Pedro Rassier dos Santos^{a*}, Rosana Basso Kraus^a, Silvia Leal Ladeira^b, Giselda Maria Pereira^c, Kamila Furtado da Cunha^a, Kevin Eduardo Palhares^a, Giniani Carla Dors^d, Helenice Gonzalez de Lima^e, Natasha Deboni Cereser^e, Patrícia da Silva Nascente^a.

^a *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil*

^b *Laboratório Regional de Diagnósticos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil*

^c *Departamento de Matemática e Estatística, Instituto de Física e Matemática, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil*

^d *Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil*

^e *Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil*

*Autor correspondente: Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil

Endereços de e-mail: rassier1907@gmail.com (P.R. Dos Santos), rosana_basso_kraus@hotmail.com (R.B. Kraus), s.ladeira@hotmail.com (S.L. Ladeira), gmpereira08@gmail.com (G.M. Pereira), kamilafurtado1@hotmail.com (K.F. Da Cunha), kevineduardo4@gmail.com (K.E. Palhares), dorsgi@yahoo.com.br (G.C. Dors), helenicegonzalez@hotmail.com (H.L. Gonzalez), natachacereser@yahoo.com.br (N.D. Cereser), pattsn@gmail.com (P.S Nascente)

Abstract

Milk is a high nutritional value food that helps in human development and growth, however, it can also harbor micro-organisms. Therefore, the objective of this work was to isolate, identify and evaluate the resistance profile and pathogenicity factors of gram-positive cocci isolated from liners in milking rooms in the south of Rio Grande do Sul, Brazil. The identification was performed through biochemical and molecular tests. Were isolated *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1) and *Streptococcus dysgalactiae* (1). The genus that proved to be resistant to most of these was the *Enterococcus*. In addition, all 17 isolates were able to form biofilm, which remained viable after the use of neutral, alkaline and alkaline-chlorinated detergent verified through the methodology of Peralta et al (2015), with modifications. The only product that was effective against biofilm of all micro-organisms was chlorhexidine 2%. The results obtained in this work highlight the importance of pre- and post-dipping tests on dairy properties, in which chlorhexidine is one of the disinfectants used, since, as observed, products indicated for cleaning and descaling pipes were not effective on biofilms of the different species tested.

Keywords: dairy production; food contamination; biofilm; mastitis.

1 Introdução

Entre as principais atividades agropecuárias do Brasil destaca-se a produção leiteira, responsável por parte da renda nacional e arrecadação tributária (IBGE, 2019). Os maiores volumes de produção são encontrados na Região Sul do país, composta pelo Rio Grande do sul, Paraná e Santa Catarina (JÚNIOR & JUNG, 2017). O leite é um alimento de alto valor nutritivo, composto por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais que auxiliam no desenvolvimento humano e, graças a essa composição nutritiva, acaba possibilitando o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (BITENCOURT et al., 2000; TEUBER, 1992).

A contagem de micro-organismos no leite é um problema constante no Rio Grande do Sul (CERVA, 2013). Além disso, sabe-se que com relação aos equipamentos dentro da sala de ordenha, as teteiras da ordenhadeira mecânica são tidas como principal fonte de contaminação entre vacas (GLEESON et al., 2009). Uma das formas de reduzir a carga microbiana no produto final é a aplicação de Boas Práticas de Produção (BPP) nas diferentes etapas do processo de produção (VALLIN et al., 2009).

Com o intuito de reduzir as fontes de infecção e aumentar a produção, o uso intensivo de antibióticos ainda é considerado o método mais utilizado dentro das salas de ordenha para o tratamento da mastite bovina e isso acaba acelerando o processo de resistência causada por mutações nos micro-organismos (ANDRADE et al., 2000; MOTA et al., 2005; WHO, 2015;). Além disso, tubulações industriais e outros circuitos de fluido favorecem o desenvolvimento e formação dos biofilmes, visto que estes são considerados locais de depósito de nutriente e difícil acesso a limpeza (CAPELLETTI, 2006).

Diante do exposto, é imprescindível avaliar a eficácia dos produtos utilizados rotineiramente nestes locais e, por isso, o objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e avaliar o perfil de resistência e fatores de patogenicidade de cocos gram-positivos isolados de teteiras em salas de ordenha.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção dos Isolados Bacterianos

Foram utilizados 17 cocos gram-positivos de oito diferentes propriedades localizadas no sul do Rio Grande do Sul, isolados de equipamentos de ordenha, e três ATCC's, 25904 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach), 12600 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbac) e 51299 (*Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz).

As amostras foram coletadas dos equipamentos de ordenhadeira (teteiras) e, em seguida, semeados em placas de Petri contendo o meio Agar sangue, com movimentos rotatórios. Após 24h de crescimento, foram isoladas colônias características de cocos gram-positivo.

2.2 Identificação Bioquímica

Todas as amostras foram repicadas em esgotamento e previamente caracterizadas bioquimicamente no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem animal (LIPOA) e no Setor de Bacteriologia do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária. A metodologia utilizada seguiu o manual Cowan e Steel's de identificação bacteriana (STEEL et al. 1993), onde foram submetidas ao teste da Catalase para diferenciar *Staphylococcus* (catalase positiva) de *Streptococcus* e *Enterococcus* (ambos catalase negativa). Amostras Catalase positiva, foram submetidas ao MR-VP (Methyl Red, Voges-Proskauer), teste da Coagulase e análises bioquímicas frente a Ribose, Nitrato, Galactose, Maltose, Manitol e Trealose, além de verificada a resistência a Polimexina.

Foi realizado CAMP para as amostras catalase negativa e os testes de Esculina, Inulina, Manitol, Salicina, Sorbitol e Trealose. Estas amostras foram colocadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), fabricado por Laboratórios Conda S.A. + NaCl 6,5% para diferenciar os *Streptococcus* spp. (não há crescimento) dos *Enterococcus* spp. (há crescimento). Após a realização dos testes as amostras foram colocadas na estufa a 37°C e após 24h fez-se a leitura.

2.3 Identificação Molecular

Para confirmação das identificações bioquímicas utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase no Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos (LBMM) da Universidade Federal de Pelotas.

Cada reação de PCR continha 6,5µL de nuclease (solvente), 12,5µL de Mix (Buffer, cloreto de magnésio e taq DNA polimerase), 0,5µL de iniciador direto, 0,5µL de iniciador reverso e 5µL de DNA. As amplificações de PCR foram realizadas a 94°C por 2min, seguidas de 30 ciclos repetitivos de 94°C por 1min, 50°C por 30s e 72°C por 1min, terminando com uma extensão final a 72°C por 5min em termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os fragmentos de DNA foram analisados em gel de agarose a 1,5%. Os *primer's* utilizados para identificação das espécies estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Sequência de pares de bases utilizados para a identificação molecular dos isolados bacterianos.

Bactéria	Sequência 5' – 3'	Nº de bases	bp	Referência	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCTT	19	941	DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, (1995)	
	ACGATTCAAAGCTAACTG	18			
<i>Enterococcus faecium</i>	GCAAGGCTTCTTAGAGA	17	550		
	CATCGTGTAAGCTAACTTC	19			
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	GAACACGTTAGGGTCGTC	18	270		FORSMAN; TILSAIA-TIMISJÄRVI; ALATOSSAVA, (1997)
	AGTATATCTTAACTAGAAAAACTATTG	27			
<i>Streptococcus uberis</i>	TAAGGAACACGTTGGTTAAG	20	330		
	TTCCAGTCCTTAGACCTTCT	20			
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CCGTATTAGCTAGTTGGTGG	20	901	WAKITA, et al., (2002)	
	GAATGATGGCAACTAAGTTC	20			
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	25	791		MASON et al., (2001)
	CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTTCG	24			

2.4 Preparo do Inóculo

Para a preparação dos inóculos os isolados foram repicados em ágar BHI e permaneceram na estufa a 37°C por 24h. Após, as colônias foram diluídas em água destilada estéril com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /mL. Esse preparo foi realizado tanto para o antibiograma, como para o teste de acúmulo de biofilme e ação dos desinfetantes.

2.5 Antibiograma

As amostras foram submetidas à avaliação de sensibilidade a treze antibióticos: Rifampicina (RIF) 5µg, Clindamicina (CLI) 2µg, Imipenem (IPM) 10µg, Levofloxacina (LVX) 5µg, Ampicilina + Sulbactam (APS) 20µg, Cefuroxima (CRX) 30µg, Ceftriaxona (CRO) 30µg, Vancomicina (VAN) 30µg, Cefotaxima (CTX) 30µg, Cefoxitina (CFO) 30µg, Piperacilina/tazobactam (PPT) 110µg, Meropenem (MER) 10µg, Oxacilina (OXA) 1µg, por meio da técnica de difusão em disco (KIRBY & BAUER, 1966).

2.6 Formação de Biofilme

Os testes foram realizados no Laboratório de Micologia e Bioprospecção, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Para o teste de formação de biofilme foram confeccionados corpos de prova, a partir de fragmentos policloreto de vinila (PVC) de 1 cm de comprimento, atóxico e estéril, de modo a deixá-las suspensas em caldo BHI, em placas de 24 poços, seguindo a metodologia de Peralta et al. (2015). Em cada poço da placa foi adicionado 1,8mL de caldo BHI, seguido de 180µL do inóculo. O material foi incubado a 37°C por 72h para a indução da formação do biofilme. A cada 24h os corpos de prova foram lavados com solução NaCl 0,9% (salina), havendo troca do meio de cultivo, com o intuito de manter apenas as células sésseis e descartar células que ficaram livres no meio, ou seja, que não se adederiram aos corpos de prova.

O experimento foi conduzido em triplicata. Cada placa possuía um controle negativo, apenas o meio BHI caldo e o corpo de prova. Como controle positivo, para avaliar a formação de biofilme, foi utilizada a ATCC 25904

(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach).

Ao final das 72h as mangueiras foram coletadas, lavadas em solução de NaCl 0,9% para dispensar as células livres, transferidas para um *eppendorf* com 1mL de solução de NaCl 0,9% e sonicadas por 30s a 30W (Processador Ultrassônico Cole-Parmer® 60648 USA) para desprender todo o biofilme na solução salina, sem que houvesse lise celular. Após, foram realizadas diluições seriadas dos suspensos até se obter a diluição de inóculo equivalente a 10^{-7} .

Todas as amostras foram plaqueadas em meio ágar BHI com duas alíquotas de 10 μ L de cada *eppendorf* e, posteriormente, incubadas a 37°C por 24h para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de acordo com Peralta et al., (2015), aplicando-se a seguinte equação:

$$\text{UFC} = (\text{n}^\circ \text{ de UFC} / \text{volume do inóculo}) \times \text{diluição}$$

Neste estudo, a concentração de 10^{-4} foi utilizada como padrão para todas as amostras, por ser a maior diluição em que foi possível fazer a diferenciação e contagem de colônias.

2.7 Ação dos produtos químicos no biofilme

Todos os micro-organismos foram testados quanto à viabilidade dos biofilmes frente a detergente neutro (LAUNER®), detergente ácido (BASPAN®), detergente alcalino-clorado (BASPAN®) e solução à base de clorexidina 2% (PRADO®). O desinfetante alcalino-clorado foi utilizado a temperatura ambiente e a 45°C, temperatura indicada pelo fabricante, e, com o intuito de avaliar se a ação do desinfetante sobre os isolados era do produto ou da temperatura (45°C), utilizou-se também um controle com água destilada a 45°C, totalizando assim, sete grupos. Para este teste, seguiu-se a metodologia de Peralta et al. (2015) com modificação, onde após as primeiras 48h de crescimento dos micro-organismos e adesão dos mesmos nas mangueiras, estas foram lavadas em solução NaCl a 0,9%, deixadas por 10min em contato com o produto nas concentrações recomendadas pelo fabricante e lavadas novamente em solução NaCl 0,9%.

Para avaliar a ação de cada produto, utilizou-se um controle de cada isolado testado, sem exposição aos produtos, para posterior comparação. Após as 72h de experimento, as amostras foram levadas para o sonicador, em *eppendorffs* com 1mL de salina, por 30s a 10W (Sonicador de S500, R2D091109 Brasil) e posteriormente retiradas as duas alíquotas de 10 μ L que foram plaqueadas em ágar BHI . Por fim,

estas foram levadas para a estufa a 37°C por 24h para a contagem das UFC's de acordo com Peralta et al. (2015).

2.8 Análise das amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise no MEV, foram utilizadas três cepas, uma de cada gênero para a verificação dos diferentes padrões de formação de biofilme entre os gêneros, sendo: ATCC 25904 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*), *Enterococcus faecalis* (1), e *Streptococcus uberis* (1).

Com a metodologia utilizada para avaliação dos desinfetantes, descrita por Peralta et al. (2015), utilizou-se a ATCC 25904 para a avaliação da formação de biofilme em diferentes tempos: 0h, 24h, 48h e 72h. Também foi avaliada a ação dos desinfetantes aplicados após 48h de formação do biofilme. Para a amostra de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus uberis* foi avaliada a ação dos grupos controles (72 h sem produto) e ação da clorexidina e detergentes. Utilizou-se um poço da microplaca como controle negativo.

Ao final do período da formação do biofilme nas amostras, retirou-se as mangueiras dos corpos de prova, com o auxílio de pinças, para que o biofilme não se desprendesse, e estas foram colocadas em *ependorf's* previamente identificados, que foram levados a estufa a 40°C por 120h.

Após este período, as amostras foram depositadas sobre fita dupla-face em *stubs* metálicos, metalizadas com ouro e observadas/fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV), dando ênfase para os aumentos de 10.000x, 5.000x e 1.000x no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande.

2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos não se apresentaram de forma paramétrica e, por este motivo, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, indicado para amostras independentes, considerando $p < 0.05$ no *Software BioEstat*® versão 5.3.

3 Resultados e Discussão

O gênero que predominou nas identificações foi o *Enterococcus* spp. com dez isolados de *Enterococcus faecalis* e quatro de *Enterococcus faecium*. Também

foram identificadas as espécies *Streptococcus uberis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1) e *Staphylococcus intermedius* (1). Essa prevalência de *E. faecalis*, quando comparado com *E. faecium*, era esperada, visto que a primeira espécie é descrita como a mais prevalente dentro do gênero (JETT et al., 1994). Ambas indicam problemas nas condições higiênico-sanitárias na obtenção do leite nas propriedades, servindo de indicadores de contaminação fecal (CASSENEGO et al. 2011; TEBALDI et al., 2008).

Dentro do gênero *Streptococcus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *uberis* estão entre as quatro espécies mais encontradas nos rebanhos bovinos, sendo frequentemente relacionados a casos de mastite ambiental (dos SANTOS et al., 2007). *Staphylococcus intermedius* também está relacionada a casos de mastite, embora com menor frequência quando comparado com as outras espécies (OLIVEIRA, et al., 2011).

O resultado do antibiograma frente aos isolados com o perfil de suscetibilidade está descrito na Tabela 2, seguindo o documento M100-S27 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Tabela 2 Perfil de suscetibilidade de cocos gram-positivos isolados de equipamento de ordenhadeira de acordo com o documento M100-S27 do CLSI, onde são classificadas como Sensível (S), Intermediária (I) e Resistente (R).

Classe Antibióticos	Quinolonas	Cefalosporinas				Carbapenêmicos			Penicilinas			Glicopeptídeos	Lincosamidas	Rifamicinas
		LVX	CFO	CTX	CRO	CRX	IPM	MER	APS	OXA	PPT			
Amostra/ATB	LVX	CFO	CTX	CRO	CRX	IPM	MER	APS	OXA	PPT	VAN	CLI	RIF	
1	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3	S	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	
4	S	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	
5	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	
6	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	
7	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	
8	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	
9	I	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	
10	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	
11	I	R	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R	S	
12	I	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	R	R	
13	S	R	I	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	
14	S	R	S	I	R	I	R	S	R	S	S	R	R	
15	S	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S	R	R	
16	S	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	R	
17	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	
18	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
19	S	R	R	R	R	S	I	S	R	S	S	R	R	
20	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	

*Rifampicina (RIF) 5µg, Clindamicina (CLI) 2µg, Imipenem (IPM) 10µg, Levofloxacina (LVX) 5µg, Ampicilina (APS) 20µg, Cefuroxima (CRX) 30µg, Ceftriaxona (CRO) 30µg, Vancomicina (VAN) 30µg, Cefotaxima (CTX) 30µg, Cefoxitina (CFO) 30µg, Piperacilina/tazobactam (PPT) 110µg, Meropenem (MER) 10µg, Oxacilina 1µg (OXA).

** (1) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* – ATCC25904; (2) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* – ATCC 12600; (3) *Enterococcus faecalis* – ATCC 51299; (4-13) *Enterococcus faecalis*; (14-17) *Enterococcus faecium*; (18) *Staphylococcus intermedius*; (19) *Streptococcus uberis*; (20) *Streptococcus dysgalactiae*.

Os únicos antibióticos que apresentaram eficácia frente a todos os microorganismos testados foram: vancomicina (VAN) 30µg, piperacilina/tazobactam (PPT) 110µg e ampicilina (APS) 20µg. Todos os isolados de *Enterococcus* e o único isolado de *Streptococcus uberis* são multirresistentes, apresentando resistência a três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2011). O gênero isolado que apresentou maior resistência foi o *Enterococcus*, com 100% dos isolados apresentando suscetibilidade a apenas três dos antibióticos testados: vancomicina (VAN) 30µg, piperacilina/tazobactam (PPT) 110µg e ampicilina (APS) 20µg. A ATCC do mesmo gênero (51299) também se destacou em relação as outras testadas.

As espécies *S. intermedius* e *S. dysgalactiae* apresentaram resistência a levofloxacina. Além disso, *S. intermedius* também apresentou resistência a clindamicina, enquanto *Streptococcus dysgalactiae* se mostrou resistente a rifampicina, não sendo considerados isolados multirresistentes. Obteve-se um isolado de *Streptococcus uberis* neste trabalho, sendo considerado um dos patógenos ambientais mais relacionado a casos de mastite em bovinos (LANGONI et al., 2011). A espécie também se mostrou resistente a classe das Cefalosporinas e aos antibióticos rifampicina, clindamicina e oxacilina.

A Figura 2 mostra a formação de biofilme em UFC/cm² de biofilme para os diferentes isolados.

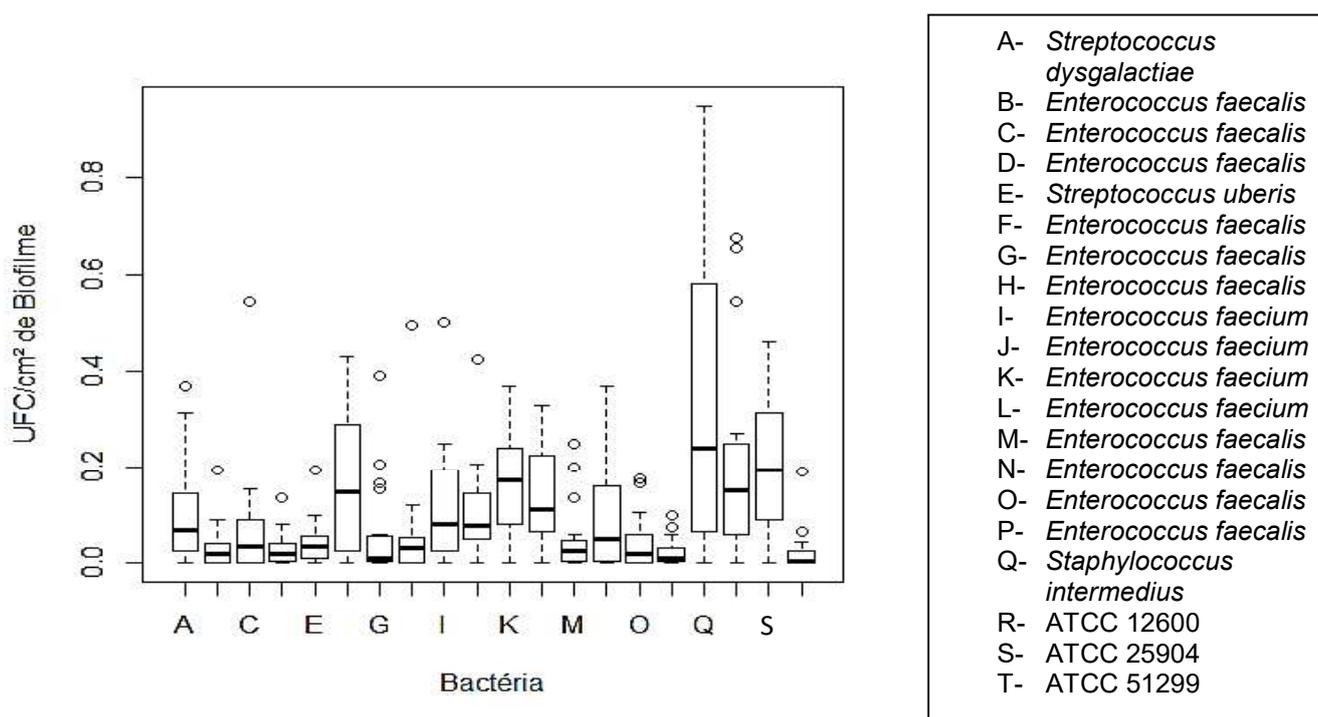


Figura 2 Produção de biofilme de acordo com cada bactéria.

Todas as amostras isoladas e ATCC's foram capazes de formar biofilme como mostra a figura 2 sendo que os únicos isolados de *S. intermedius* (P) e *S. dysgalactiae* (A), todos isolados de *E. faecium* (I, J, K, L), três isolados de *E. faecalis* (C, F, N) e a ATCC 12600 (R) formaram biofilme estatisticamente igual a ATCC 25904. As outras amostras formaram menos biofilme que a ATCC.

A ATCC 25904 (*Staphylococcus aureus*) foi utilizada como controle para a formação de biofilme, visto que a mesma vem sendo utilizada em outros trabalhos como controle da formação de biofilme dentro da espécie (da SILVA et al., 2019; XU & SIEDLECKI, 2012). Na Figura 3 é possível verificar a formação do biofilme formado por esta nas mangueiras em diferentes tempos 0h, 24h, 48h, 72h.

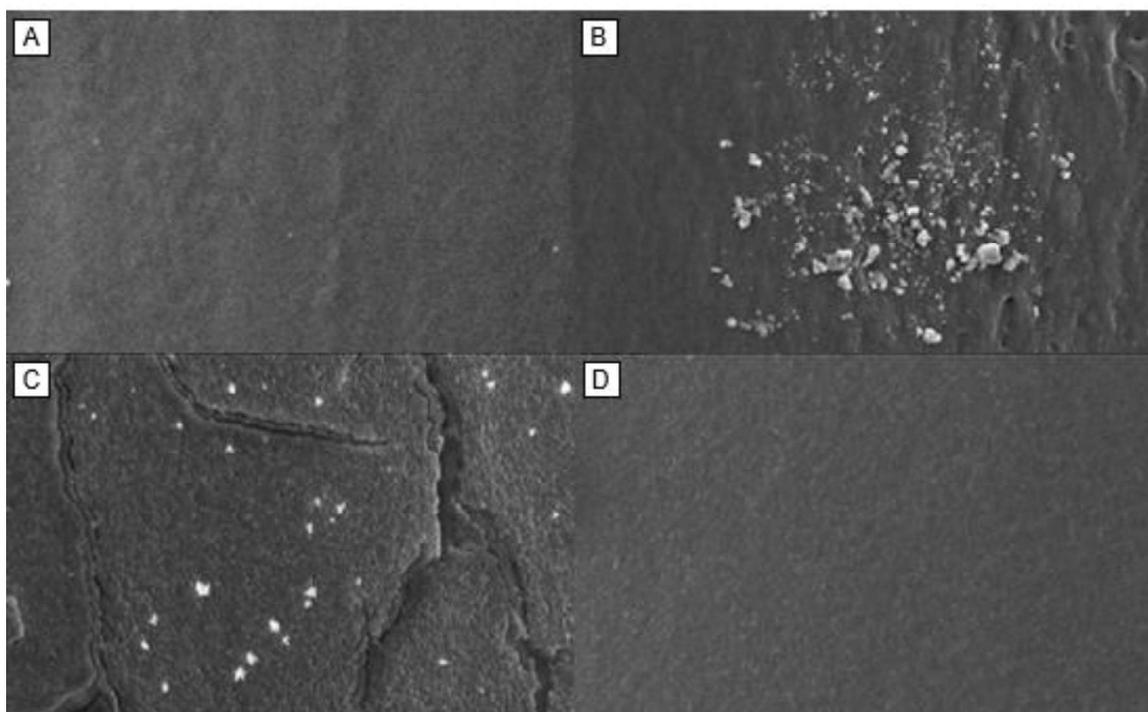


Figura 3 Formação de biofilme no grupo controle (ATCC 25904), onde a figura A representa o biofilme formado nas mangueiras de sala de ordenha na hora 0, B em 24 horas, C nas 48 horas e D nas 72 horas.

A figura 3(A) foi tirada na hora 0, sendo possível verificar que não há adesão de células sésseis. A adesão se inicia na Figura 3(B) após 24h de contato da bactéria com meio de cultivo. É possível observar células aderidas e uma predominância de exopolissacarídeo, o que acaba fazendo com que a adesão do biofilme sobre as mangueiras da sala de ordenha seja irreversível (CAPELLETTI, 2006). Na Figura 3(C) o biofilme está bem consolidado e a multiplicação celular atingiu um nível alto, com muitas células sésseis. Na Figura 3(D) a visualização

das células é difícil e isso se justifica pelo estágio avançado que o biofilme se encontra, com muita produção de exopolissacarídeo, que acaba conferindo proteção e dificultando a diferenciação das células. Quando aproximamos esta mesma imagem é possível perceber que a quantidade de células sob a matriz ainda é bem intensa (Figura 4). É possível observar uma densa matriz de exopolissacarídeo e grande quantidade de células sob a mesma na Figura 4(a) com o aumento de 5.000x e na Figura 4(b) com o aumento de 23x, o biofilme bem espesso apresentando algumas rachaduras em consequência da metodologia de secagem do material e perda de H₂O.

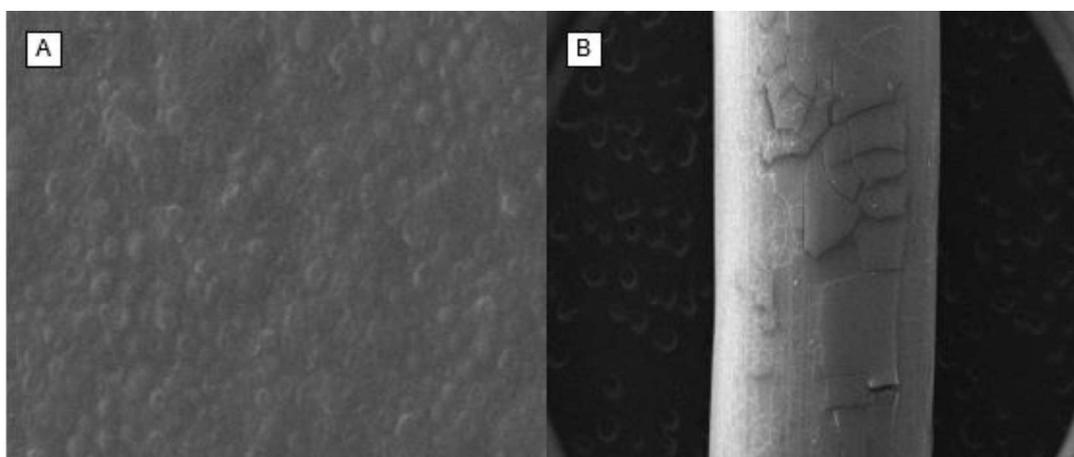


Figura 4 Biofilme formado por *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 25904™) após 72 horas em contato com o meio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI).

Entre as duas espécies isoladas de *Enterococcus*, *E. faecalis* possui maior aptidão na formação de biofilme quando comparados com *E. faecium* (MOHAMED & HUANG, 2007), embora neste estudo foi observado o contrário (maior formação de biofilme por *E. faecium*). Proteínas enterocócicas de superfície, substância de agregação e proteína de ligação ao colágeno são fatores de adesão encontrados em *Enterococcus* que facilitam o estabelecimento do biofilme (MOHAMED & HUANG, 2007).

Na Figura 5 é apresentado algumas imagens das formações de biofilme, após 72 h, nas diferentes espécies isoladas.

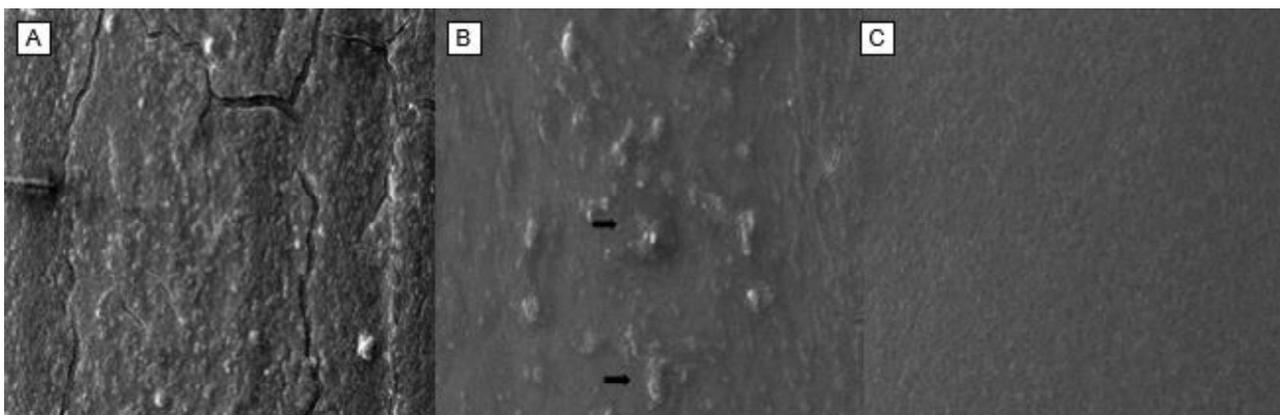


Figura 5 Biofilme formado após 72 horas das mangueiras em contato com inóculo e meio de cultivo, onde (a) *Enterococcus faecalis* (b) *Streptococcus uberis* (c) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25904).

As setas da Figura 5(b) salientam para formações de biofilme maduro, onde foi possível visualizar agrupamentos que cresceram em altitude com relação as mangueiras onde se aderiram. Esses agrupamentos, quando aproximados, revelaram se tratar de biofilmes bem estabelecidos, com células sendo liberadas de seu centro, como mostra a Figura 6.

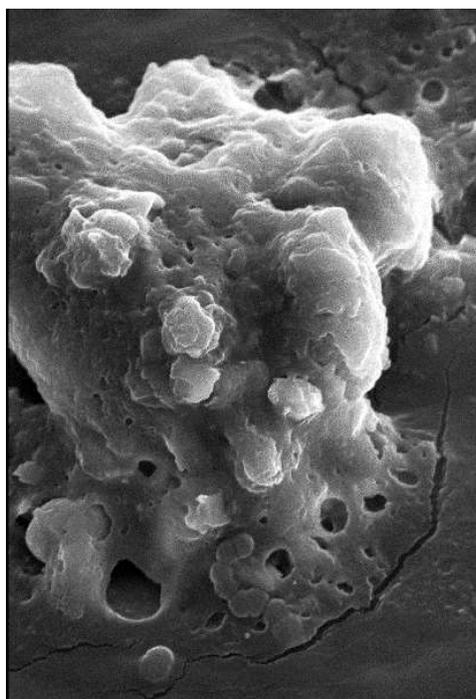


Figura 6 Biofilme formado por *Streptococcus uberis*, onde é possível observar as diferentes composições de sua estrutura.

Para Verran (2002), essas estruturas servem como potencial de biotransferência, onde micro-organismos presentes na superfície dos equipamentos, antes ou após o procedimento de higienização, podem servir como possíveis contaminantes de produtos alimentícios durante o processamento. Na mesma Figura, é possível observar canais que servem como troca de material entre o meio externo e interno do biofilme, além de uma cadeia celular característica de *Streptococcus* na base, com células dispostas em cadeias.

Quando foi realizado a comparação entre os tratamentos, o produto que se mostrou mais eficiente foi a clorexidina 2%. O resultado apresentado com relação a formação de biofilme após a utilização dos diferentes produtos está representado na Figura 7.

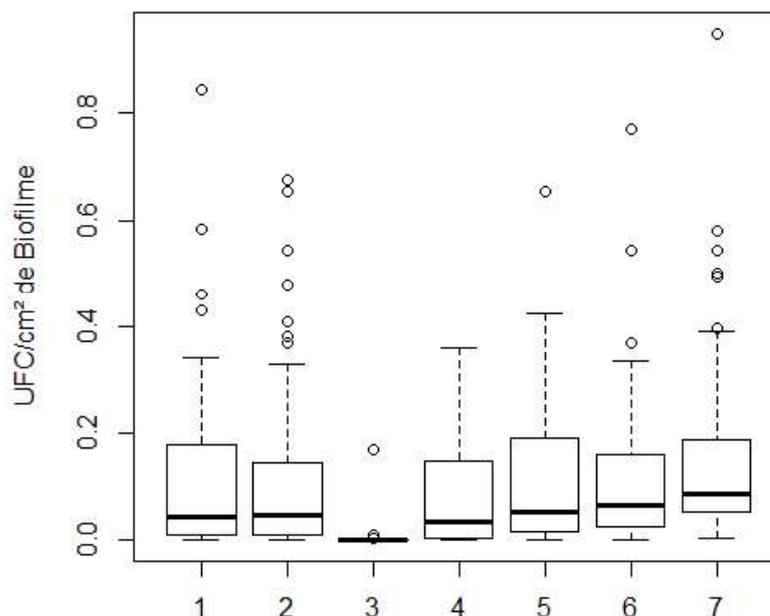


Figura 7 Produção de biofilme com os diferentes tratamento, onde 1 corresponde ao controle sem ação de produto, (2) detergente neutro, (3) clorexidina, (4) detergente ácido, (5) detergente alcalino-clorado, (6) detergente alcalino-clorado a 45°C, (7) H₂O a 45°C.

Neste estudo, percebemos que as mangueiras ligadas a teteiras em sala de ordenha podem servir como fonte de contaminação, mesmo após o uso dos detergentes ácido, alcalino-clorado e neutro. O único produto que teve efeito sob os biofilmes das diferentes espécies foi a clorexidina 2%. Os resultados vão de encontro aos resultados encontrados por Bohrz (2015), quando verificou as condições higiênico-sanitárias de teteiras e outros equipamentos dentro da sala de

ordena e verificou a presença de bactérias, mesmo logo após a utilização de sanitizantes. Medeiros et al. (2009) obtiveram bons resultados quando testaram a clorexidina 2% em *Staphylococcus* isolados de mastite bovina subclínica e constataram que quanto maior o tempo de aplicação do produto, melhor sua eficácia. O maior tempo que testaram da clorexidina em contato com a bactéria foi de 5min e observaram que a mesma matou 93,30% dos isolados de *Staphylococcus aureus* e 81,8% dos *Staphylococcus* coagulase positiva não *aureus*.

Com relação ao detergente neutro, a concentração indicada pelo fabricante varia de acordo com a sujidade do material a ser limpo. Para limpezas leves o fabricante indica de 50 a 200mL do produto para cada 10L de água, enquanto que para limpeza pesada a concentração pode variar de 200 a 1000mL de produto para 10L de água. Neste trabalho utilizamos a concentração de 200mL, concentração que pode ser utilizada para todos os tipos de limpeza, porém, não observamos resultado na desestruturação dos biofilmes formados ao final das 72h.

Esta resistência dos *Enterococcus* vem sendo descrita em diversos trabalhos (CHOPRA & ROBERTS, 2001; KHAN et al. 2005; LOZANO & TORRES, 2017), sendo que a resistência observada de *Enterococcus faecalis* e *faecium* as Cefalosporinas (Cefuroxima, Ceftriaxona, Cefotaxima e Cefoxitina) estão de acordo com a literatura, pois segundo Shepard & Gilmore (2002) estas bactérias possuem resistência intrínseca mediada por genes cromossomais a esta classe de antibióticos, como para sulfonamidas, clindamicida e níveis baixos de β lactâmicos e aminoglicosídeos. Além disso, os mesmos autores descrevem que este gênero é capaz de adquirir resistência a todas as classes de antimicrobianos (SHEPARD & GILMORE, 2002).

Há cerca de 40 anos o *Enterococcus* era considerado um gênero inofensivo, com micro-organismos presentes no trato gastrointestinal de humanos e animais de forma comensal (PALMER et al., 2010), porém tem se observado a emergência de espécies causando infecções em hospitais, principalmente as encontradas neste estudo, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (HIDRON et al., 2008). Dentro do gênero, se conhece mais a epidemiologia de *Enterococcus faecalis* que apresenta como fatores de virulência a presença de citolisina e substâncias

agregativas, que possibilitam a transferência de plasmídeos durante o processo de conjugação (TRABULSI et al., 2004). O maior problema relacionado a presença destas espécies no estudo é que estas servem como potenciais fontes de genes de resistência para outros micro-organismos, através da transferência horizontal mediada por esses plasmídeos (PALMER et al., 2010). Em 1992, Noble e colaboradores constataram, em laboratório, a capacidade de *Enterococcus faecalis* transferir genes de resistência à vancomicina para *Staphylococcus aureus*, principal agente etiológico de mastite em bovinos (BRITO & BRITO, 1998; SÁ et al., 2004).

Rosvoll et al. (2010) avaliaram através da técnica de PCR, a presença de plasmídeos em 93 cepas de *E. faecium* e concluíram que 88 cepas apresentavam de um a sete plasmídeos inseridos em seu material genético e que estes estavam relacionados a grande parte da transferência horizontal de genes. As bactérias deste estudo foram isoladas de teteiras, onde inicia as tubulações que levam o leite bovino até os tanques de refrigeração, e como parte das propriedades são de produtores que, eventualmente, vendem ou consomem o leite sem processamento, acaba sendo um problema de saúde pública, pois os genes de resistência podem chegar até os humanos através da cadeia alimentar (MADELA et al., 2017).

Além da transferência de plasmídeos, a resistência adquirida pelos *Enterococcus* pode estar relacionada a transferência de *transposons*, trocas cromossômicas e mutação (CETINKAYA et al., 2013). A principal preocupação relacionada a resistência de *Enterococcus* é o surgimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) que é considerada uma das alternativas para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram positivas, principalmente em cepas multirresistentes (KHAN et al., 2005; WILLEMS et al., 2011). Além disso, *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) podem também apresentar resistência a ampicilina, pela associação de elementos genéticos móveis, de diferentes genes adquiridos. Resende et al. (2014) realizaram um estudo em Porto Alegre e constataram que 100% das cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina também apresentavam resistência a ampicilina. No nosso estudo, vancomicina e ampicilina foram eficazes frente a todos os isolados, inclusive aos *Enterococcus*.

4 Conclusão

Com esses resultados podemos concluir a importância da realização dos testes de *pré* e *pós dipping* para o controle de contaminações dentro da sala de ordenha, visto que após o biofilme estabelecido nas tubulações, dificilmente os detergentes irão agir sobre eles. Além disso, uma rotina de higienização bem feita, troca de teteiras e manejo adequado dos animais certamente reduziria os índices aqui encontrados. Nossas conclusões abrem portas para novas alternativas para serem usadas dentro deste setor, com o intuito de inibir a contaminação microbiana, ao mesmo passo que não ofereça riscos para a contaminação do produto (leite).

Verificamos que a contaminação das teteiras de sala de ordenha estão intimamente relacionadas ao manejo inadequado dos animais e equipamentos, visto que os micro-organismos encontrados indicam contaminação fecal e ambiental. Grande parte desses micro-organismos foram resistentes aos antibióticos testados e foram capazes de formar biofilme e se aderirem ao material das tubulações da sala de ordenha. Embora alguns tenham formado menos que outros, todos permaneceram viáveis aos detergentes indicados para limpeza das tubulações, mostrando-se suscetíveis apenas a clorexidina 2%.

Declaração de Interesse

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida com o apoio dos laboratórios de Biologia Molecular de Microorganismos (LBMM), Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem animal (LIPOA) e do setor de Bacteriologia do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária, todos pertencentes a Universidade Federal de Pelotas.

Financiamento

Este estudo contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Destaques

- Método de avaliação *in vitro* de formação de biofilme em ordenhadeira
- Bactérias isoladas de sala de ordenha produzem biofilme
- Clorexidina possui eficácia na desinfecção de equipamentos leiteiros

Referências

- ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*. v. 1, n. 1, p. 53- 57, 2000. Disponível em <<https://repositorio.bc.ufg.br/xmlui/bitstream/handle/ri/12390/Artigo%20-%20Maria%20Auxiliadora%20Andrade%20-%202000.pdf?sequence=5&isAllowed=y>> Acesso em 10 jan. 2020
- BITENCOURT, D. et al. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000.
- BOHRZ, Daniela de Avila Silva. Biofilm formation and antimicrobial multidrug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milking hygienization environment. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Ciências Biológicas) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015. Disponível em <<http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/49>> Acesso: 24 dez. 2019.
- BRITO, José Renaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. **Embrapa Gado de Leite-Documentos (INFOTECA-E)**, 1998. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/593442/1/Programasdecontroledasmastites.pdf>> Acesso: 7 dez. 2019
- CAPELLETTI, Raquel Vannucci. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006. 96f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266382>> Acesso: 7 dez. 2019.
- CASSENEGO, Ana Paula Vaz et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa veterinária brasileira. Rio de Janeiro. Vol. 33, n. 12, p. 1433-1440**, 2013. Disponível em <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/101644/000932194.pdf?sequence=1>> Acesso: 02 jan. 2020.
- CERVA, Cristine. Manual de boas práticas na produção de leite em propriedades de agricultura familiar do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: FEPAGRO, 2013. Disponível em <http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/20130730144014manual_boas_praticas_leite.pdf> Acesso: 02 jan. 2020.
- CETINKAYA, Figen et al. Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant *Enterococci* in animal originated foods. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, n. 5, p. 588-593, 2013. DOI: [10.3906/vet-1211-34](https://doi.org/10.3906/vet-1211-34)
- CHOPRA, Ian; ROBERTS, Marilyn. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- CLSI. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*, 27th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

DA SILVA, Gloria Narjara Santos et al. Triterpene Derivatives as Relevant Scaffold for New Antibiofilm Drugs. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 58, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom9020058>

DOS SANTOS, Emília Maricato Pedro et al. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007. DOI: [10.22456/1679-9216.15805](https://doi.org/10.22456/1679-9216.15805)

DUTKA-MALEN, Sylvie; EVERS, Stefan; COURVALIN, Patrice. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1434-1434.1995>

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Gado do Leite – Importância Econômica. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>> Acesso em 24 jun 2019

FORSMAN, Päivi; TILSAIA-TIMISJÄRVI, Anu; ALATOSSAVA, Tapani. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v. 143, n. 11, p. 3491-3500, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3491>

GLEESON, D. et al. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish veterinary journal**, v. 62, n. 7, p. 461, 2009. DOI: [10.1186/2046-0481-62-7-461](https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-7-461)

HIDRON, Alicia I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1086/591861>

IBGE, IBGE Indicadores. estatística da produção pecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2019_3tri.pdf> Acesso: 17 jan. 2020.

JETT, Bradley D.; HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Virulence of enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.7.4.462>

JÚNIOR, Alexandre Aloys Matte; JUNG, Carlos Fernando. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, v. 19, n. 1, p. 34-47, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.17058/agora.v19i1.8446>

KHAN, Saeed A. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 19, n. 1, p. 27-34, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.09.001>

KIRBY, W. M. et al. Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. **Antibiotics annual**, 1956.

LANGONI, H., PENACHIO, D. D. S., CITADELLA, J. C., LAURINO, F., FACCIOLI-MARTINS, P. Y., LUCHEIS, S. B., ... & SILVA, A. V. D. (2011). Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária**

Brasileira, 31(12), 1059-1065. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001200004>

LOZANO, Carmen; TORRES, Carmen. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, V. 35, P. 2-8, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(17\)30028-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(17)30028-9)

MADELA, N. K., SILVA, S. Q., NOGUEIRA, M. C. L., & COLOMBO, T. E. Isolamento, identificação e detecção de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovinas e suínas. **J Health Sci Inst.** 2017;35(2):87-9 Disponível em:

<https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2017/02_abr-jun/V35_n2_2017_p87a90.pdf> Acesso 17 jan. 2020.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MASON, William J. et al. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3332-3338, 2001. DOI: <https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.39.9.3332-3338.2001>

MEDEIROS E.S., SANTOS M.V., PINHEIRO JÚNIOR J.W., FARIA E.B., WANDERLEY G.G., TELES J.A.A. & MOTA R.A. 2009. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100011>

MOHAMED, Jamal A.; HUANG, David B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0>.

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26406>

NOBLE, W. C.; VIRANI, Zarina; CREE, Rosemary GA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS microbiology letters**, v. 93, n. 2, p. 195-198, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05089.x>

OLIVEIRA, Carlos Magno C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000200002>

PALMER, Kelli L.; KOS, Veronica N.; GILMORE, Michael S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 5, p. 632-639, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mib.2010.08.004>

PERALTA, Sonia L., et al. "Comparison of growth of viable oral bacteria and *Streptococcus mutans* in biofilm models using three different culture media." **African**

Journal of Microbiology Research 9.6 (2015): 388-393. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7288>

RESENDE, Mariah et al. Emergence of vanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 160-167, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.4126>

ROSVOLL, Torill CS et al. PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501-and pHT β -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 254-268, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00633.x>

SÁ, Marcos Eielson Pinheiro de et al. Importance of *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis: presence of enterotoxins, shock syndrome toxin and relationship with somatic cell count. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 321-326, 2004. DOI: [0.1590/S1413-95962004000500005](https://doi.org/10.1590/S1413-95962004000500005)

SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01530-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01530-1)

STEEL, Kenneth John; BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. Cambridge university press, 1993.

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300036>

TEUBER, M. Microbiological problems facing the dairy industry. **Bulletin of the IDF**, v. 276, p. 6-9, 1992.

TRABULSI, Luiz Rachid; DE TOLEDO, M. R. F. Microbiologia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 266-266, 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651991000400017>

VALLIN, Vitória Maria et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/2661/2313>> Acesso: 14 dez. 2019.

VERRAN, Joanna. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential?. **Food and bioproducts processing**, v. 80, n. 4, p. 292-298, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1205/096030802321154808>

WAKITA, Yoshihisa et al. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16S rDNA sequence. **Journal of veterinary medical science**, v. 64, n. 7, p. 603-605, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.64.603>

WILLEMS, Rob JL et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 5, p. 872-900, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x>

WHO 2015. World Health Organization. Antibiotic resistance. Disponível em < <https://www.who.int/> > . Acesso 2 jan. 2020.

XU, Li-Chong; SIEDLECKI, Christopher A. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 72-81, 2012. DOI: <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1016%2Fj.actbio.2011.08.009>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enterococcus spp. foram os micro-organismos predominantemente isolados das mangueiras de teteiras das salas de ordenha deste estudo, com maior predominância de *Enterococcus faecalis* (10), seguidos de *Enterococcus faecium* (4). Obtivemos também um isolado das espécies: *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*.

Com relação ao perfil de suscetibilidade, os únicos antibióticos que se mostraram eficazes a todos os micro-organismos isolados foram: vancomicina (VAN) 30µg, piperacilina/tazobactam (PPT) 110µg e ampicilina (APS) 20µg.

Todos os micro-organismos isolados neste estudo foram capazes de formar biofilme em equipamentos de sala de ordenha, o que acaba dificultando a limpeza dos mesmos.

Os três gêneros isolados neste estudo apresentaram um biofilme maduro após 72h, a partir de análises no Microscópio Eletrônico de Varredura.

O único composto que foi eficaz frente a todos os micro-organismos em biofilme, após 48h, foi a clorexidina, salientando a importância da utilização de pré e pós-dipping, métodos onde esse composto é empregado.

REFERÊNCIAS

AMORENA, Beatriz et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 43-55, 1999.

ANAND, Sanjeev et al. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 18-33, 2014.

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*. v. 1, n. 1, p. 53- 57, 2000.

BITENCOURT, D. et al. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000.

BLASCHEK H.P., WANG H.H., AGLE M.E. **Biofilms in the food environment**. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, p.194 2007.

BLOWYE, R.W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. 2nd ed. London: Cab, 2010. 266 p.

BRASIL. Instrução Normativa n° 77, de 26 de novembro de 2018. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2018/12/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-77.2018.pdf> Acesso: 15 jan. 2020.

BRITO, José Renaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. **Embrapa Gado de Leite-Documents (INFOTECA-E)**, 1998.

BRITO, M. A. V. P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.

BROOKS, John D.; FLINT, Steve H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 12, p. 2163-2176, 2008.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006. 96f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <
<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266382>> Acesso em: 7 dez. 2019.

CARVALHO, G. R. & ROCHA, D. T.. Déficit na balança comercial pode ser revertido. Anuário do leite 2019. Embrapa gado de leite. Juíz de fora, MG. Disponível em: <https://www.embrapa.br/GADO-DE-LEITE> Acesso em: 19 agosto. 2019.

CARVALHO, Aparecida Selsiane Sousa et al. Susceptibilidade de Staphylococcus aureus isolados de leite cru a antibióticos comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.

CEPEDA, Jorge A. et al. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two centre study. **The Lancet**, v. 365, n. 9456, p. 295-304, 2005.

CERVA, Cristine. Manual de boas práticas na produção de leite em propriedades de agricultura familiar do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: FEPAGRO, 2013.

CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W. G. Physical and chemical properties of biofilms. **Biofilms**, v. 93, p. 130, 1990.

CONLEY, Joslyn et al. Biofilm formation by group a streptococci: is there a relationship with treatment failure?. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4043-4048, 2003.

COSTA, E. O. et al. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 45, n. 1-10, p. 65-71, 1998.

COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CUNHA, Adriano França da et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 160-166, 2015.

DA COSTA, G. M. et al. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy herds from the state of Minas Gerais, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

Demeu, F. A., Lopes, M. A., Costa, G. M. D., Rocha, C. M. B. M. D., Santos, G. D., & Franco Neto, A. (2011). Influence of involuntary of matrices culling on the economic impact of mastitis in dairy herd. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1), 195-202.

Etifu, M., & Tilahun, M. (2019). Prevalence of bovine mastitis, risk factors, isolation and anti-bio gram of major pathogens in Mid Rift valley, Ethiopia.

FACKLAM, Richard R.; MARIA DA GLORIA, S. Carvalho; TEIXEIRA, Lucia M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: **The Enterococci**. American Society of Microbiology, 2002. p. 1-54.

FONSECA, Luís Fernando Laranja da; SANTOS, Marcos Veiga dos. Qualidade do leite e controle de mastite. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Dairy Production and Products – Milk Production. Disponível <<http://www.fao.org/dairy-production-products/en/#.V3AZwbgrLIV>>em Acesso em 14 jan. 2020.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar, trad. **Maria Carolina Mardi Guimarães e Cristina Leonhardt**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Gemechu, T., Yunus, H. A., Soma, M., & Beyene, A. (2019). Bovine mastitis: Prevalence, Isolation and identification of major bacterial pathogens in selected areas of Bench Maji Zone, Southwest Ethiopia.

GURUNG, Jeetendra et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 17, n. 4, p. 214, 2013.

GLEESON, D. et al. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish veterinary journal**, v. 62, n. 7, p. 461, 2009.

HOFFMANN, Fernando Leite et al. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanificantes de uso industrial. **Hig. aliment**, p. 62-67, 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Indicadores) (2019) Estatística da produção pecuária, Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2019_3tri.pdf>

Acesso em 12 jan. 2020.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2017). Produção da Pecuária Municipal. 43: 1-49. Rio de Janeiro. Disponível em <

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf > Acesso em 06 abr. 2019.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712 p.

JETT, Bradley D.; HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Virulence of enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KUMAR, C. Ganesh; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LAFARGE, Véronique et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

LÄMMLER, C.; HAHN, G. Streptokokken In: Blobel, H. und Schließer, T.(eds): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/2: Streptokokken-Infektionen und Rotlauf. 1994.

LAWRENCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, 1991.

Lima, M. C., Souza, M. C., Espescht, I. F., Maciel, P. A., Sousa, J. E., Moraes, G. F., ... & Moreira, M. A. (2018). Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(9), 1742-1751.

LUCCA, Emerson Juliano; AREND, Silvio Cezar. A pecuária leiteira e o desenvolvimento da Região Noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Desenvolvimento Regional**, v. 7, n. 3, p. 107-142, 2020.

MAIA, Guilherme Baptista da Silva et al. Produção leiteira no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p. 371-398, 2013.

MALANI, Preeti N.; KAUFFMAN, Carol A.; ZERVOS, Marcus J. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: **The Enterococci**. American Society of Microbiology, 2002. p. 385-408.

MARSHALL, K. C.; STOUT, RUBY; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 337-348, 1971.

MEDEIROS, Elizabeth Sampaio de 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009.

MELDAU, D.C. A microbiota do leite de vaca. In: JAY, James M. (Org.). *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Mesquita, A. A., da Costa, G. M., Pinto, S. M., Borges, J. C., da Costa Custódio, D. A., & da Silva, D. B. (2020). prevalência e resistência a antibióticos de *staphylococcus aureus* e *streptococcus agalactiae* em propriedades de agricultura familiar em rebanhos leiteiros de minas gerais, brasil.

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

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,

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

NERO, Luís Augusto; VIÇOSA, Gabriela Nogueira; PEREIRA, Flávio Evans Vilela. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NEUPANE, Sanjeev et al. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 5, n. 1, p. 5, 2016.

NOEL, Caroline da Costa 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**, v. 7, n. 1, p. 22-26, 2016.

OLIVEIRA, Carlos Magno C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

OLIVER, S. P. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. **American journal of veterinary research**, v. 49, n. 11, p. 1789-1793, 1988.

OLSON, Merle E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian journal of veterinary research**, v. 66, n. 2, p. 86, 2002.

PASCHOAL, J. J. Qualidade do Leite. In: SILVA, J. C. P. M. et al. (Ed.). Manejo e Administração na Bovinocultura Leiteira. Viçosa, 2014. p. 181-198.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Biológico, São Paulo**, v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.

PEREIRA M.O.B.O. 2001. Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilmes. Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Braga. 234p.

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira et al. Identificação de bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

PYÖRÄLÄ, Satu. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p. 211-216, 2002.

QI, Lihua et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 483, 2016.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

REIS, Eduardo Mitke Brandão et al. Identificação de pontos fracos e fortes associados à qualidade do leite em propriedade leiteiras de agricultura familiar. **PUBVET**, v. 11, p. 840-946, 2017.

SÁ F.V. 1996. AS VACAS LEITEIRAS. CLÁSSICA EDITORA, LISBOA, P.287-325.

SÁ, Marcos Eielson Pinheiro de et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 321-326, 2004.

SANTOS, Marcos Veiga dos. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. **Simpósio internacional sobre produção intensiva de leite** (8., 2007, Uberlândia), 2007.

SCHLEIFER, Karl H.; KILPPER-BÄLZ, Renate. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 31-34, 1984.

SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 295p.

SILVEIRA, Ivana Aparecida da; CARVALHO, Eliana Pinheiro de; TEIXEIRA, Damáris. Influência de microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. **Hig. aliment**, p. 21-7, 1998.

SMITH, K. Larry; HOGAN, Joseph S. Environmental mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 489-498, 1993.

SMITH, K. Larry; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention¹, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1531-1553, 1985.

SOUZA, Mariluce Paes de; AMIN, Mário M.; GOMES, Sebastião Teixeira. Agronegócio leite: características da cadeia produtiva do estado de Rondônia. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2009.

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.

TEIXEIRA LM, SIQUEIRA-CARVALHO MG, FACKLAM RR 2007. *Enterococcus*. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry, MA Pfaller (eds.), Manual of clinical microbiology, ASM Press, Washington DC, p. 430-442.

TEIXEIRA, Lúcia Martins; MERQUIOR, Vânia Lúcia Carreira. Enterococcus. In: **Molecular Typing in Bacterial Infections**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 17-26.

TEUBER, M. Microbiological problems facing the dairy industry. **Bulletin of the IDF**, v. 276, p. 6-9, 1992.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 11, p. 2366-2374, 1995.

VALLIN, Vitória Maria et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VIEIRA, M. J.; 1995. **Estudo da formação de filmes biológicos por Pseudomonas fluorescens e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino**. Universidade do Minho, Braga, Portugal. Tese de doutorado.

Wald, R., Baumgartner, M., Gutschireiter, J., Bazzanella, B., Lichtmannsperger, K., Wagner, M., ... & Stessl, B. (2020). Comparison of the population structure of *Streptococcus uberis* mastitis isolates from Austrian small-scale dairy farms and a Slovakian large-scale farm. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1820-1830.

WHO 2015. World Health Organization. Antibiotic resistance. Disponível em < <https://www.who.int/> > . Acesso 2 jan. 2020.

WILLIAMSON, Russell et al. Studies on the mechanism of intrinsic resistance to β -lactam antibiotics in group D streptococci. **Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 813-822, 1983.

ZADOKS, R. N. et al. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. **Epidemiology & Infection**, v. 130, n. 2, p. 335-349, 2003.

ZAFALON, L. F. et al. Boas práticas de ordenha. **Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos**, 2009.