

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
- MEDICINA VETERINÁRIA/ MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA**

**AÇÃO DE PRODUTOS PÓS-*DIPPING* SOBRE A
ADESÃO DE *Staphylococcus* spp. E BIOFILME
CONSOLIDADO**

MONOGRAFIA DE PROGRAMA DE RESIDÊNCIA

Maria Marinês Reis Peixoto

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**AÇÃO DE PRODUTOS PÓS- *DIPPING* SOBRE A ADESÃO DE
Staphylococcus spp. E BIOFILME CONSOLIDADO**

por

Maria Marinês Reis Peixoto

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora: Agueda Castagna de Vargas, Dra.
Co-orientadora: Sônia de Avila Botton, Dra.**

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciência da Saúde
Centro de Ciências Rurais
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina
Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Monografia de Programa de Residência

AÇÃO DE PRODUTOS PÓS-*DIPPING* SOBRE A
ADESÃO DE *Staphylococcus* spp. E BIOFILME
CONSOLIDADO

elaborada por
Maria Marinês Reis Peixoto

Como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Medicina
Veterinária Preventiva

Comissão Examinadora:

Agueda Castagna de Vargas, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Jackeline Karsten Kirinus, Dra. (UNOESC)

Janislene Mach Trentin, Ms. (UFRGS)

Santa Maria, 28 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Leticia Trevisan Gressler e ao Fernando Sutilli pela enorme disposição e empenho que foi fundamental na elaboração desse trabalho.

À professora Sônia Botton pela ajuda na aquisição dos produtos testados.

À professora Agueda P. C. Vargas pela orientação e ensinamentos.

À equipe do LABAC pelos conhecimentos compartilhados, parceria e amizade.

RESUMO

Monografia de Programa de Residência
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

AÇÃO DE PRODUTOS PÓS-*DIPPING* SOBRE A ADESÃO DE *Staphylococcus* spp. E BIOFILME CONSOLIDADO

AUTORA: Maria Marinês Reis Peixoto
ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas
CO-ORIENTADORA: Sônia de Avila Botton
Santa Maria, 28 de março de 2014.

A mastite bovina é uma enfermidade comum em rebanhos de bovinos leiteiros que pode causar enormes prejuízos se não for controlada. *Staphylococcus* spp. estão envolvidos na maioria dos casos levando principalmente a mastites subclínicas de difícil eliminação. Uma possível explicação para a persistência desses patógenos seria a capacidade dos estafilococos sobreviverem em comunidades bacterianas denominadas biofilmes, que conferem a proteção das bactérias às condições adversas e podem estar presentes tanto na glândula mamária como nos equipamentos e no ambiente de ordenha. A aplicação de produtos pós-*dipping* nos tetos após a ordenha é uma medida de manejo fundamental para a prevenção de novos casos de mastite. Sabe-se que esses produtos possuem boa ação sobre células livres de micro-organismos causadores de mastite, porém não há pesquisas que avaliam a sua ação biofilmes dos mesmos. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a ação de dois produtos pós-*dipping* a base de clorexidine e de iodo na prevenção da adesão, bem como a ação sobre biofilmes consolidados de 16 amostras de *Staphylococcus* spp. De forma geral, os desinfetantes não impediram a adesão da maioria das amostras, apesar de agirem eliminando as células livres, e assim como houve pouca ação sobre os biofilmes consolidados. Dessa forma, salienta-se a importância da prevenção da colonização do teto por micro-organismos contagiosos, evitando, assim, as infecções decorrentes da formação de biofilme.

Palavras-chave: desinfetantes, sanidade, prevenção, mastite.

ABSTRACT

Monografia de Programa de Residência
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

ACTION OF TEAT DIPPING PRODUCTS ON THE ADHESION OF *Staphylococcus* spp. AND CONSOLIDATED BIOFILM

AUTHOR: Maria Marinês Reis Peixoto
ADVISER: Agueda Castagna de Vargas
CO-ADVISER: Sônia de Avila Botton
Santa Maria, March 28th, 2014

Bovine mastitis is a common disease in herds of dairy cattle that can cause huge losses if not controlled. *Staphylococcus* spp. are involved in most cases mainly subclinical mastitis with difficult removal. One possible explanation for the persistence of these pathogens would be the ability of staphylococci survive in bacterial communities called biofilms, which confers protection of bacteria to adverse conditions and may be present in both the mammary gland as well as equipment and the milking environment. The application of teat dipping product after milking is a fundamental management measure for prevention of new cases of mastitis. It is known that these products have good action on mastitis cell-free microorganisms, but there are no studies that assess their action on biofilms. This work aimed to evaluate the effect of two teat dipping products based on chlorhexidine and iodine on preventing adhesion products as well as the action on consolidated biofilms of 16 strains of *Staphylococcus* spp. Generally, disinfectants did not prevent the adhesion of most samples, although act eliminating the free cells, and there was little action on the consolidated biofilms. Thus, we highlight the importance of prevention of colonization of the teat by infectious microorganisms, thereby preventing infections resulting from biofilm formation.

Key words: disinfectants, sanity, prevention, mastitis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Atividade de produtos a base de iodo (A e B) e clorexidine (C e D) sobre a adesão de SCN (A e C) e SCP (B e D). CTL – controle; PBI – produto a base de iodo; PBC – produto a base de clorexidine. (*) Indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, conforme determinado por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....24
- Figura 2** – Atividade de produtos a base de iodo (A e B) e clorexidine (C e D) sobre biofilme formado de SCN(A e C) e SCP (B e D). CTL – controle; PBI – produto a base de iodo; PBC – produto a base de clorexidine. (*) Indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, conforme determinado por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....25

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

% – por cento

°C – Graus Celsius

CIM – Concentração inibitória mínima

DO – Densidade óptica

EPS – Exopolissacarídeo

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

PBS – *Phosphate buffered saline* = Tampão fosfato salino.

QS – *Quorum sensing*

rpm – Rotações por minuto

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

TSB – *Tryptone Soya Broth*

UFC – Unidade formadora de colônia

US\$ – Dólares americanos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Mastite bovina	11
2.2. <i>Staphylococcus</i> spp. presentes em sistemas de produção leiteira	12
2.3. Biofilmes	13
2.4. Pós-dipping.....	14
3. CAPÍTULO 1.....	16
Ação de produtos a base de clorexidine e iodo sobre a adesão e biofilme consolidado de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite	17
ABSTRACT.....	17
RESUMO	17
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina está presente em praticamente todos os rebanhos leiteiros devido às condições de criação a que os animais estão submetidos, que inclui as ordenhas diárias com manipulação e a exposição do canal do teto, predispondo à entrada de patógenos e consequentes casos da doença (LADEIRA, 2007). Mesmo que a ordenha seja feita da forma mais higiênica possível, a transferência de micro-organismos entre os animais ordenhados é muito comum durante a sua execução. Após a ordenha, a pele dos tetos fica altamente contaminada por micro-organismos que podem adentrar a glândula mamária e causar novas infecções (SANTOS & FONSECA, 2007).

Neste sentido, torna-se importante a utilização de produtos pós-*dipping* com imersão total dos tetos após a ordenha, pois a taxa de novas infecções está relacionada com o número de agentes patogênicos presentes na extremidade dos tetos (SANTOS & FONSECA, 2007). O uso de produtos desinfetantes para higienização dos tetos garante, além da desinfecção, permite a construção de uma barreira física contra micro-organismos, mesmo várias horas após a aplicação (EDINGER et al., 2000).

Esses desinfetantes na maioria das vezes possuem boa ação sobre os agentes causadores de mastite. No entanto, as falhas na utilização desses produtos envolvem a diluição na propriedade, presença de matéria orgânica, armazenamento incorreto ou aplicação que não cubra a maior parte da superfície do teto e podem comprometer a ação dos produtos (SANTOS & FONSECA, 2007).

A presença de micro-organismos na forma de biofilmes pode ainda ser a causa da persistência de fontes de contaminação que resistem a formas convencionais de desinfecção (CLONTS, 2008). Estima-se que aproximadamente 80% dos micro-organismos existentes vivam em biofilmes e 75% das infecções humanas estejam associadas a sua formação e persistência (JACQUES et al., 2010). Esse dado reforça a necessidade de conferir se os produtos desinfetantes conseguem agir sobre essas estruturas e diminuir ou eliminar a carga contaminante.

Com base no que foi descrito acima, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de dois produtos comerciais pós-*dipping* sobre biofilmes de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica provenientes de duas propriedades leiteira da região de Santa Maria – RS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite bovina

A mastite bovina é considerada a doença mais importante na produção leiteira, pois prejudica a saúde e o bem-estar animal, causa severas quedas produtivas, aumenta os custos com os tratamentos e os descartes, podendo inclusive levar à morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). Estima-se que haja prejuízos de cerca de US\$ 1,8 bilhão ao ano nos Estados Unidos, o que representa cerca de US\$ 200 por animal (SANTOS & FONSECA, 2007).

Os índices de mastite subclínica no mundo estão em torno de 40% das vacas infectadas e 25% de quartos infectados (LADEIRA, 2007). No Rio Grande do Sul, um estudo recente avaliou oito rebanhos que totalizavam 423 animais encontrou uma prevalência de 53,6% de casos de mastite subclínica por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Isso demonstra um alto índice de ocorrência e pode representar severas perdas no setor leiteiro (BANDEIRA et al., 2013).

Essa enfermidade consiste da inflamação da glândula mamária ocasionada por diversos agentes, especialmente devido a bactérias. A resposta inflamatória ocorre com o objetivo de eliminar o agente etiológico, neutralizar as toxinas e regenerar os tecidos danificados. A mastite tem início quando os micro-organismos atravessam o canal do teto e multiplicam-se no interior da glândula mamária. A contaminação da glândula pode ocorrer de diversas formas, incluindo: a colonização da pele e do canal do teto entre as ordenhas, devido às flutuações de vácuo durante a ordenha, que introduzem os micro-organismos para dentro do teto, bem como por meio de cânulas contaminadas no momento do tratamento intramamário (SANTOS & FONSECA, 2007).

Os agentes bacterianos causadores de mastite são classificados como micro-organismos contagiosos ou ambientais. Os contagiosos colonizam a glândula mamária e podem ser transmitidos pela máquina de ordenha e pelas mãos dos ordenhadores, causando um quadro de mastite subclínica sem alterações aparentes. Os micro-organismos ambientais geralmente não são habitantes da glândula mamária, mas podem causar enfermidades quando contaminam o ambiente, a pele dos tetos e úbere ou a máquina de ordenha e, dessa forma, ganham acesso à cisterna do teto, levando a um quadro clínico de mastite (DIVERS & PEEK, 2008). É estimado que em uma propriedade exista um caso de mastite clínica para outros 14 casos de mastite subclínica (LADEIRA, 2007).

Os principais patógenos contagiosos incluem: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma* spp. e *Corynebacterium* spp. Entre os patógenos ambientais, destacam-se: *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter aerogenes* e outros estafilococos (DIVERS & PEEK, 2008; RADOSTITS, 2002).

As infecções crônicas subclínicas são o maior reservatório de *Staphylococcus aureus* e constituem um grande risco para os outros animais ainda não infectados, pois uma vez estabelecido no rebanho, torna-se difícil a sua eliminação (DIVERS & PEEK, 2008). A habilidade de produzir biofilmes com capacidade de adesão é considerado um importante fator de virulência de estafilococos (STEPANOVIC et al., 2007), o que pode estar associado a dificuldade de eliminação do agente nas propriedades.

2.2. *Staphylococcus* spp. presentes em sistemas de produção leiteira

Staphylococcus spp. são considerados importantes agentes causadores de mastite, responsáveis por inúmeras perdas produtivas. Essas bactérias são classificadas como cocos Gram-positivos, catalase positiva e oxidase negativa, podendo apresentar-se em pares, pequenas cadeias ou cachos. São aeróbios ou facultativamente anaeróbios, não apresentam motilidade, não formam esporos e podem ser classificados como coagulase positiva (SCP) ou negativa (SCN) (QUINN et al., 2002; LADEIRA, 2007). A coagulase é verificada pela capacidade de conversão de fibrinogênio em fibrina, sendo que a deposição desta é considerada uma forma de proteção para os estafilococos expostos às células fagocitárias (QUINN et al., 2002). Este é um importante fator de virulência presente em algumas espécies, como por exemplo: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schlieferi* spp. *coagulans*, *S. delphini*. Porém, a maioria das espécies de estafilococos são coagulase negativa (SONGER & POST, 2005).

Staphylococcus aureus é uma das espécies mais comumente envolvida em casos de infecções intramamárias em bovinos, além de ser responsável pelas maiores perdas econômicas relacionadas à queda na produção e qualidade do leite em todos os continentes (BANDEIRA, 2013). Assim como *S. aureus*, outras espécies também são importantes como causadoras de mastite, entre elas: *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. epidermidis* (LADEIRA, 2007).

As mastites estafilocócicas podem ser agudas, mas a maioria se apresenta na forma crônica ou subclínica (LADEIRA, 2007). A auto cura normalmente é rara e as glândulas

infectadas podem sofrer dano permanente com fibrose e formação de micro-abscessos no parênquima (DIVERS & PEEK, 2008).

O tratamento durante a lactação geralmente tem uma baixa taxa de cura, que fica em torno de 40%. Razões para esse baixo índice incluem a possível diminuição da atividade das drogas devido à produção de biofilmes pelos estafilococos, assim como também outros fatores entre os quais: a utilização de drogas ineficazes, a baixa dosagem, a resistência de algumas cepas, a presença de detritos da reação inflamatória e a incapacidade da droga de alcançar o micro-organismo devido à formação de abscessos e lesões fibrosas (DIVERS & PEEK, 2008). A suscetibilidade antimicrobiana determinada *in vitro* tem sido considerada uma condição prévia para o tratamento, mas a eficácia *in vivo* não garante a eficácia *in vitro* no tratamento de mastite bovina (GUARDABASSI et al., 2010).

2.3. Biofilmes

Os biofilmes são comunidades bacterianas que se desenvolvem tanto em superfícies bióticas quanto abióticas. Essas comunidades são estruturadas e envoltas em uma matriz composta de exopolissacarídeo (EPS). Essa matriz confere a proteção dos micro-organismos contra situações adversas, entre elas a ação de antimicrobianos, desinfetantes, células do sistema imune, radiações, variações de temperatura, pH e umidade e exaustão de nutrientes e água. Dessa forma, os biofilmes representam uma estratégia de sobrevivência microbiana em que há o desenvolvimento de novas células que podem persistir como causa de infecções, além de se destacar e se disseminar para outras superfícies (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2005; STEPANOVIC et al., 2007; JACQUES et al., 2010). A maioria das cepas de *S. aureus* associadas a mastites são encontrados envoltas pelo EPS que permite a aderência e a colonização da bactéria no epitélio da glândula mamária (BASELGA et al., 1993).

A formação de biofilmes acontece em um processo de dois estágios. Começa com a aderência da bactéria na superfície (estágio de adesão) e continua com a proliferação e diferenciação das células (estágio de maturação) (CHEN & WEN, 2011; SIMOJOKI et al., 2012).

A fase de adesão é possibilitada pela expressão de múltiplas adesinas. Em estafilococos, os genes *icaABC* estão envolvidos na síntese de polissacarídeo intercelular adesina (PIA), localizado na superfície da célula, permitindo a aderência da bactéria (HEILMANN et al., 1996). Durante a maturação, as bactérias produzem o EPS que irão

circundar e unir a comunidade bacteriana, formando assim uma estrutura plana ou tridimensional (JACQUES et al., 2010).

A composição da matriz do biofilme varia de acordo com a espécie de bactéria e as condições de crescimento (JACQUES et al., 2010). Os maiores componentes são proteínas e polissacarídeos (75-89%), havendo também ácidos nucleicos, lípidos e fosfolípidos. Dessa forma, o EPS age como uma barreira contra as condições adversas (SIMÕES et al., 2010).

Dentro do biofilme existe ainda um sistema de comunicação entre as células microbianas chamado *quorum sensing* (QS). As bactérias produzem moléculas sinalizadoras e conseguem detectar os sinais enviados por outras bactérias, constituindo assim o QS (CHEN & WEN, 2011). Esses sinais influenciam várias funções biológicas importantes para adaptação ao ambiente e desempenham papel importante no estágio de maturação da formação do biofilme, regulando a diferenciação celular e desenvolvimento das estruturas (JACQUES et al., 2010; CHEN & WEN, 2011). A alta densidade celular resulta em altas concentrações de moléculas sinalizadoras que induzem a expressão de genes, os quais promovem mudanças fisiológicas nas células vizinhas e atividades microbianas importantes que incluem a síntese de EPS, desenvolvimento do biofilme e fatores de virulência (SIMÕES et al., 2010).

A formação de biofilmes é suspeita de ser o meio pelo qual os estafilococos causadores de mastites evadem do sistema imune e causam infecções intramamárias persistentes (OLIVEIRA et al., 2007; SIMOJOKI et al., 2012). Sabe-se que o tratamento de infecções estafilocócicas associadas a biofilmes é mais difícil, uma vez que dentro do biofilme o micro-organismo está mais resistente aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro (JACQUES et al., 2010). Fox et al. (2005) descreveram a formação de biofilmes *in vitro* por estafilococos provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, da pele do úbere e das superfícies internas dos equipamentos de ordenha, sendo essa formação mais significativa no primeiro caso.

Considerando que alguns tratamentos de mastite nem sempre levam à cura completa, uma das hipóteses que melhor explica a ocorrência dessa resistência é a habilidade de muitos estafilococos de crescer em biofilmes em tecidos infectados, desenvolvendo assim, uma resistência inata aos agentes terapêuticos (MELCHIOR et al., 2006).

2.4. Pós-dipping

O objetivo da desinfecção dos tetos é reduzir o máximo possível a contaminação após a ordenha, pois o principal mecanismo de transmissão da mastite contagiosa é a colonização do teto. A utilização do pós-*dipping* pode determinar uma redução de mais de 50% de novos casos de mastite contagiosa, além de auxiliar no condicionamento dos tetos e na recuperação das lesões de pele (SANTOS & FONSECA, 2007).

A taxa de novas infecções intramamárias está diretamente relacionada ao número de micro-organismos causadores de mastite presentes na pele dos tetos. Sendo assim, a imersão dos tetos em produtos desinfetantes após a retirada das unidades de ordenha elimina a grande maioria dos patógenos e reduz o risco das bactérias atingirem a glândula mamária (SANTOS & FONSECA, 2007). Galton (2004) avaliou a importância do uso de pós-*dipping* na redução de novas infecções intramamárias causadas por *S. aureus* e observou que houve diminuição de 64,5% no grupo que recebeu tratamento a base de iodo em comparação ao grupo controle, perante o mesmo desafio. Em outro estudo que avaliou um produto a base de amônia quaternária houve redução de 70,9% de novos casos de mastite por *S. aureus* (BODDIE & NICKERSON, 2002)

Devido às variações no perfil de suscetibilidade de células bacterianas, pode ser necessária uma avaliação periódica de desinfetantes em propriedades leiteiras para que não ocorra o comprometimento dos programas de controle de mastite bovina causadas por *Staphylococcus* spp. (MEDEIROS et al., 2009). Alguns estudos já avaliaram a ação *in vitro* dos desinfetantes disponíveis no mercado sobre *Staphylococcus* spp. na forma planctônica em que houve boa ação dos diferentes princípios ativos (MEDEIROS et al., 2009; RAMALHO et al., 2012), porém não há pesquisas sobre a ação dos mesmos sobre biofilmes desse gênero.

Entre os princípios ativos utilizados na desinfecção dos tetos destaca-se o iodo por reunir várias características desejáveis, incluindo: amplo espectro de ação, excelente estabilidade, facilidade de visualização após a aplicação e ausência de resíduos no leite desde que as práticas de manejo sejam feitas de forma adequada. No entanto, sua eficácia é diminuída frente à presença de matéria orgânica. Já o clorexidine também possui alta eficácia para a desinfecção dos tetos, ampla atividade microbiana e não é inativado por pequenas quantidades de matéria orgânica, tais como sangue, leite, pus e fluidos teciduais (SANTOS & FONSECA, 2007).

3. CAPÍTULO 1

Ação de produtos a base de clorexidine e iodo sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. isolados de leite

Maria Marinês Reis Peixoto, Agueda Castagna de Vargas

(Artigo a ser submetido para publicação – Pesquisa Veterinária Brasileira)

Ação de produtos a base de clorexidine e iodo sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. isolados de leite

Maria Marinês Reis Peixoto, Agueda Castagna de Vargas

ABSTRACT. – *Staphylococcus* spp. are recognized as important causes of mastitis in dairy herds. These microorganisms have the ability to produce a structure called biofilm, which is responsible for the survival and often for resistance to the action of disinfectants and other harsh conditions. In this paper we evaluate the action of two teat dip products based on iodine (0,7%) and chlorhexidine (2,0%) on the adhesion of coagulase-positive staphylococci (CPS) and coagulase negative staphylococci (CNS) from subclinical mastitis cases, and also on its consolidate biofilms. The products tested showed a high reduction in the on the adhesion of all isolates. However, action on the consolidate biofilm was significant for CNS only, and unsatisfactory for CPS. Thus, it emphasizes the importance of health programs to prevent biofilm formation and reduce the sources of contamination of the mammary gland in dairy production systems.

INDEX TERMS: teat dipping, disinfectant, mastitis, prevention.

RESUMO. - *Staphylococcus* spp. são reconhecidos como importantes causadores de mastites em rebanhos leiteiros. Esses micro-organismos têm a capacidade de produzir uma estrutura denominada biofilme, que é responsável pela sobrevivência e muitas vezes pela resistência à ação de produtos desinfetantes e às demais condições adversas. Neste trabalho avaliou-se a ação de dois produtos pós-*dipping* a base de iodo (0,7%) e clorexidine (2,0%) sobre a adesão de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) isolados de casos de mastite subclínica, e também sobre biofilmes pré formados a partir destes isolados. Os produtos testados apresentaram uma alta redução na taxa de adesão de todos os isolados. No entanto, a ação sobre os biofilmes consolidados só foi significativa sobre os SCN, embora não tenha sido satisfatória em nenhum dos grupos. Assim, ressalta-se a importância dos programas sanitários a fim de prevenir a formação de biofilmes e diminuir as fontes de contaminação da glândula mamária em sistemas de produção leiteira.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: pós-*dipping*, desinfetantes, mastite, prevenção.

INTRODUÇÃO

A mastite infecciosa bovina é uma enfermidade associada à redução da produção e alterações na composição do leite, bem como ao descarte de animais (Barlow 2011). Os micro-organismos de origem contagiosa são os mais prevalentes em casos de mastite bovina e, entre esses, o gênero *Staphylococcus* destaca-se por estar frequentemente associado a casos clínicos e subclínicos da enfermidade (Sá et al. 2004). São muitos os fatores de risco envolvidos na ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros. Esses fatores muitas vezes expõem a superfície dos tetos aos micro-organismos patogênicos contagiosos, os quais são transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha (Amaral et al. 2004).

O uso de produtos desinfetantes no pós-*dipping* é uma estratégia de controle de mastites contagiosas, principalmente aquelas causadas por *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Santos & Fonseca 2007) e garante, além da desinfecção, a construção de uma barreira física contra infecções, mesmo várias horas após a aplicação (Edinger et al. 2000). Estudos já demonstraram a importância do uso do pós-*dipping* na redução da incidência de novas infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus* spp. e outros patógenos relacionados a casos de mastites, bem como, a diminuição da contagem de células somáticas (Galton 2004; Boddie & Nickerson 2002). Os *Staphylococcus* spp. são reconhecidamente a causa mais frequente de infecções associadas a biofilmes, especialmente devido ao fato de serem agentes comensais, presentes na pele e superfícies mucosas (Otto 2008).

Os biofilmes são comunidades bacterianas, envoltas por uma matriz polimérica extracelular (Stepanovic et al. 2007). A formação do biofilme inicia com a adesão da célula bacteriana à superfície, seguida da sua maturação, ruptura e dispersão (Vermelho et al. 2007). Sabe-se que *S. aureus* e *S. epidermitis*, oriundos de casos de mastite, possuem alta capacidade de adesão em superfícies abióticas, formando, posteriormente, biofilmes altamente organizados (Oliveira et al. 2006). Tendo em vista a importância da adesão no processo de colonização e invasão de micro-organismos patogênicos, o uso *in vitro* de antimicrobianos na sua prevenção está muito bem documentado (Pagano et al. 2004).

Estudos têm demonstrado a eficácia de desinfetantes frente a *Staphylococcus* spp. isolados de leite, sendo bem determinado que concentrações de iodo acima de 0,5% e clorexidine a 2% exercem atividade bactericida frente a esses micro-organismos (Pedrini & Margatho 2003; Medeiros et al. 2009; Ramalho et al. 2012). Porém, devido às variações no perfil de suscetibilidade de células bacterianas frente a desinfetantes, é necessária uma avaliação periódica destes produtos para que não haja comprometimento dos programas de controle de mastite bovina causadas por *Staphylococcus* spp. (Medeiros et al. 2009). Além disso, estudos avaliando a ação destes produtos sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. isolados de leite não foram conduzidos ainda. Com base no exposto acima, o presente estudo buscou avaliar a ação de clorexidine (2%) e iodo (0,7%) na adesão de células livres de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), bem como sobre seus biofilmes consolidados.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Amostras individuais, colhidas assepticamente, de leite de vacas pertencentes a duas propriedades leiteiras de Santa Maria – RS foram semeadas em ágar sangue ovino 5% e incubadas em aerobiose à 37°C durante 48 horas. Colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp. foram caracterizadas fenotipicamente conforme descrito por Quinn et al. (1994). Realizou-se o teste de coagulase conforme MacFaddin (2000). Para realização deste estudo, foram selecionados 16 isolados de *Staphylococcus* spp., oito coagulase positiva, provenientes de uma propriedade com casos característicos de mastite por SCP; e oito coagulase negativa, provenientes de outra propriedade.

Caracterização dos isolados quanto à produção de biofilmes

A caracterização dos isolados foi realizada de acordo com Rodrigues et al. (2010). Colônias isoladas de *Staphylococcus* spp. foram inoculadas em 3 ml de Tryptone Soya Broth (TSB) até turvação de 0.5 MacFarland e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, 5 µl foram inoculados em placas de microdiluição contendo 195 µl de TSB e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação (50 rpm). Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e este foi lavado duas vezes com PBS 1x estéril, para remoção de células livres (planctônicas). As placas foram deixadas em temperatura ambiente até a secagem, onde as células aderidas eram então coradas com violeta de genciana a 0,25%. Após 5 minutos da aplicação do corante, os poços foram novamente lavados, por duas vezes com PBS, e submetidos à secagem em temperatura ambiente. O que restou na placa foi ressuscitado em álcool:acetona na proporção 80:20. Em cada placa utilizou-se um poço contendo somente TSB como controle negativo. A leitura foi realizada por espectrofotometria no aparelho SpectraMax M5 a 495 nm. Para classificar os isolados quanto a produção de biofilme, mediu-se a DO₄₉₅ do controle negativo (DO_{cn}) e comparou-se com a DO₄₉₅ dos isolados (DO_{is}). Os isolados foram classificados como fracos (DO_{cn}<DO_{is}<2.DO_{cn}), moderados (2.DO_{cn}<DO_{is}<4.DO_{cn}) ou fortes (4.DO_{cn}<DO_{is}).

Preparo do inóculo

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram semeados em *Tryptone Soya Broth* (TSB) com 1% de glicose e incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, a concentração bacteriana foi ajustada para 5x10⁷ UFC/ml através de diluições em TSB e medições da densidade óptica. A concentração bacteriana utilizada constitui o desafio recomendado pelo *National Mastitis Council* para protocolos de avaliação de eficácia de produtos pós-dipping (National Mastitis Council 2004).

Produtos testados

Foram testados dois produtos disponíveis comercialmente, a base de clorexidine (2%) e iodo (0,7%). Segundo as normas dos fabricantes, ambos os produtos são prontos para o uso, e, portanto, não foram diluídos.

Ação dos desinfetantes sobre a adesão de Staphylococcus spp.

A avaliação dos desinfetantes sobre a adesão dos isolados de *Staphylococcus* spp. analisados seguiu a metodologia descrita por Pagano et al. (2004), com pequenas adaptações, como a substituição de placas de 96 poços por placas de 24 poços. Foram destinados dois poços para cada isolado. No primeiro poço, denominado controle positivo, a suspensão foi constituída de meio TSB com 1% de glicose (1,2 ml) e do inóculo (0,1ml). No segundo poço realizou-se o mesmo procedimento acrescentando-se ainda o desinfetante a ser testado (0,8 ml). O procedimento foi realizado em triplicata. Cada placa continha ainda

um controle negativo com apenas o meio TSB. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação (50 rpm). Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e este foi lavado duas vezes com PBS 1x estéril, para remoção de células livres (planctônicas). As placas foram deixadas em temperatura ambiente até a secagem, onde as células aderidas eram então coradas com violeta de genciana a 0,25% (0,3 ml). Após 5 minutos da aplicação do corante, os poços foram novamente lavados, por duas vezes com PBS, e submetidos à secagem em temperatura ambiente. O que restou na placa foi ressuscitado em álcool:acetona na proporção 80:20 (0,3 ml). O efeito dos desinfetantes sobre a adesão das células foi medido por espectrofotometria no aparelho SpectraMax M5 a 495 nm. Testes piloto foram conduzidos a fim de determinarmos o comprimento de onda ideal (dados não mostrados). Para compensar a absorbância medida a partir dos desinfetantes e do meio TSB, leituras de densidade óptica (DO) foram realizadas em poços contendo apenas iodo (0,7%) com TSB e clorexidine (2%) com TSB. Estes valores foram descontados das leituras realizadas nos poços com desinfetante, meio e inóculo bacteriano. Antes da adição do corante, alíquotas de 10 µl de cada poço tratado foram semeadas em TSA a fim de verificarmos se as concentrações dos desinfetantes testadas apresentavam capacidade bactericida sobre os isolados *Staphylococcus* spp. analisados, na forma planctônica.

Ação dos desinfetantes sobre biofilme consolidado

Essa segunda etapa da pesquisa procedeu-se de forma semelhante à primeira. Também foram destinados dois poços para cada amostra, com a suspensão constituída de meio TSB com 1% de glicose (1,2 ml) e do inóculo (0,1ml), que foram incubados por 24 horas a 37°C sob agitação (50 rpm), porém sem a aplicação do desinfetante em um primeiro momento. Após a incubação e obtenção de películas características de formação de biofilme, o meio foi aspirado cuidadosamente e realizaram-se duas lavagens com PBS 1x estéril em todos os poços. A seguir, aplicou-se TSB com 1% de em ambos os poços (1,2 ml) e o desinfetante somente no segundo poço. As placas foram novamente incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período, realizou-se duas lavagens, com PBS 1x estéril, seguido de secagem a temperatura ambiente, e então os poços foram corados com violeta de genciana a 0,25% (0,3 ml). Após 5 minutos da aplicação da violeta de genciana, os poços foram novamente lavados, por duas vezes com PBS, e submetidos à secagem em temperatura ambiente. O que restou na placa foi ressuscitado em álcool:acetona na proporção 80:20 (0,3 ml). O efeito dos desinfetantes sobre os biofilmes formados foi medido por espectrofotometria no aparelho SpectraMax M5 a 495 nm. Antes da adição do corante, alíquotas de 10 µl de cada poço tratado foram semeadas em TSA a fim de verificarmos se as concentrações dos desinfetantes testadas apresentavam capacidade bactericida sobre os isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, na forma sésil.

Critérios interpretativos

A interpretação dos valores de adesão foi realizada conforme Pagano et al. (2004). Valores de DO_{495} acima da DO observada nos controles com desinfetante mais TSB foram considerados como valores indicativos de aderência bacteriana. O cálculo de porcentagem de inibição de adesão foi realizado para todos os isolados que apresentaram aderência, sendo a seguinte fórmula utilizada: % de adesão = $(DO \text{ do poço controle} - DO \text{ do poço tratado}) / DO \text{ do poço controle} \times 100$. Sendo a DO representada pela média das triplicatas e o controle definido por cultivo livre de desinfetante.

Análise estatística

A homogeneidade das variâncias entre os grupos foi verificada através do teste de Levene. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey (Statistica 7.0 Software). O nível mínimo de significância foi estabelecido em $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Caracterização dos isolados quanto à produção de biofilmes

Todos os isolados foram caracterizados como produtores de biofilme. Em relação à intensidade de formação, tanto os SCP, como os SCN foram classificados como fortes formadores de biofilme, uma vez que apresentaram DO acima de no mínimo quatro vezes a DO do seu respectivo controle.

*Ação dos desinfetantes sobre a adesão de *Staphylococcus* spp.*

Do total de isolados de *Staphylococcus* spp. analisados (16), 14 (87,5%, sete SCP e sete SCN) e 12 isolados (75%, oito SCP e quatro SCN) apresentaram adesão mesmo quanto expostos aos produtos a base de clorexidine (2%) e iodo (0,7%), respectivamente. Observou-se redução significativa da adesão em

todos os isolados submetidos aos desinfetantes (Fig. 1). A taxa percentual de redução da adesão foi de 92,8 a 97%. O produto a base de iodo inibiu em 92,8 e 97% a adesão de células de SCP e SCN, respectivamente. Já o produto a base de clorexidine apresentou a mesma atividade em ambos os grupos de *Staphylococcus* spp., com 94,3% de redução. Como era esperado, não foram recuperadas bactérias viáveis após as 24 horas de exposição aos desinfetantes.

Ação dos desinfetantes sobre biofilme consolidado

Tanto o clorexidine (2%) quanto o iodo (0,7%) apresentaram redução significativa sobre o biofilme formado por SCN (Fig 2), sendo esta 36,7% no clorexidine e 32,5% no iodo. Frente aos isolados de SCP, não foi observada redução significativa em comparação com o grupo controle (Fig. 2). Todos os poços tratados apresentaram crescimento bacteriano após 24 horas de exposição aos desinfetantes.

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm avaliado a concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos, relacionando-a com a CIM necessária para impedir a adesão bacteriana e formação de biofilme ou até mesmo, agir em biofilme consolidado (Pagano et al. 2004). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo avaliando a ação de produtos a base de clorexidine (2%) e iodo (0,7%) sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa. Como as concentrações de clorexidine 2% e iodo 0,7% são conhecidamente eficazes contra células livres de *Staphylococcus* spp. (Pedrini & Margatho 2003), não era esperada a recuperação de células viáveis após 24 horas de exposição aos desinfetantes, porém, até a obtenção dos resultados, não se sabia se estas concentrações seriam capazes de prevenir a adesão das células.

No presente estudo, observou-se que 87,5% e 75% dos isolados analisados foram capazes de se aderir à superfície de polipropileno sob a ação do clorexidine e do iodo, respectivamente. No entanto, houve uma redução de 92,8 a 97% na adesão quanto comparada ao grupo controle (Fig. 1). Galton (2004) observou uma redução de 64,5% de novos casos de mastite por *S. aureus* em quartos mamários submetidos ao pós-dipping, o que pode ser explicado pela forte ação dos produtos utilizados, já que infecções podem ser prevenidas se a adesão de micro-organismos patogênicos for evitada (Pagano et al. 2004).

Apesar dos produtos a base de iodo e clorexidine serem amplamente utilizados no tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas, e este último apresentar efeito antibacteriano cumulativo de no mínimo seis horas (Spinosa et al. 2002), o processo de adesão de *Staphylococcus* sp. é muito rápido, menos de três horas (Milezzi et al. 2012), especialmente em condições favoráveis. As condições empregadas *in vitro*, neste estudo, como a adição de glicose ao meio de cultura, podem ter favorecido a adesão dos isolados analisados. A glicose, pela alteração de pH, é um importante fator ambiental associado à formação de biofilme em *S. epidermidis* através da regulação de proteínas via expressão de genes como o *saeRS* (Lou et al. 2014). Sabe-se que a presença de dextrano, que consiste de unidades de α -D-glicose, é fundamental para a adesão de isolados de *Streptococcus* spp (Thompson et al. 1982). Estes dados podem explicar, em parte, a aderência dos isolados de *Staphylococcus* spp., mesmo que não tenham sido recuperadas células viáveis após 24 horas de exposição aos desinfetantes.

Proteínas são muito importantes na formação de biofilme em *S. epidermidis* (Lou et al. 2014). Segundo Varhimo et al. (2011), alfa e beta-caseína são indutores primários para a formação de biofilme, a qual inicia-se com a adesão a uma superfície, seja ela biótica ou abiótica (Hall-Stoodley & Stoodley 2002). Considerando que após a ordenha o teto encontra-se sujeito a deposição destas proteínas, e estas favorecem a formação de biofilme, salientamos a importância de avaliar produtos utilizados no pós-dipping quanto a sua capacidade de impedir a adesão de células bacterianas, bem como, sua ação sobre biofilme consolidado.

Sabe-se que células em biofilmes são muito mais resistentes à desinfecção quando comparadas às células planctônicas, desta forma, muitos métodos convencionais de desinfecção são ineficientes contra biofilmes, sendo necessário, por vezes, doses elevadas de desinfetantes (Clonts 2008). Neste estudo, os isolados de *Staphylococcus* spp. presentes no biofilme consolidado apresentaram uma forte resistência, sendo que células viáveis foram recuperadas após 24 horas de exposição aos desinfetantes analisados. Segundo Marques et al. (2007), *S. aureus* na forma de biofilme se torna mais resistente aos agentes sanitizantes. Esta resistência é associada tanto à baixa penetração dos compostos antimicrobianos no biofilme, como pelo estado fenotipicamente protegido induzido nas bactérias que o compõe (Costeron et al. 1995, Altieri et al. 2013). Por fim, sua estabilidade deve-se a proteínas e carboidratos (Wang et al.

2013), que, uma vez depositados, dificultam em muito a ação de compostos sanitizantes e antimicrobianos.

Muitos desinfetantes apresentam ação em suspensões microbianas, porém, sobre biomassas a atividade diminui muito, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento de formas de resistência por parte do biofilme (Pereira 2001). Esta maior resistência foi verificada nos SCP, uma vez que, frente aos desinfetantes analisados, praticamente não se observou redução da biomassa (Fig. 2). No entanto, tanto o clorexidina quanto o iodo, apresentaram um efeito significativo na redução do biofilme formado por SCN (Fig. 2). Isso pode ser explicado pela menor virulência apresentada por estes isolados, que geralmente causam mastites mais brandas e respondem bem aos tratamentos (Pyorala & Taponen 2009).

Salienta-se que a utilização de desinfetantes no pós-dipping tem diferentes funções, nas quais a prevenção da adesão bacteriana, com intuito de retardar a formação do biofilme, deve ser garantida, uma vez que, eliminar ou reduzir a biomassa bacteriana é extremamente difícil. Por fim, este estudo reforça a importância da inclusão de estratégias de controle sanitário para prevenção de mastite, uma vez que o contato dos animais com patógenos contagiosos durante o processo de ordenha é praticamente inevitável.

CONCLUSÃO

Os produtos a bases de clorexidina (2%) e iodo (0,7%) não foram capazes de inibir a adesão da maioria dos isolados analisados, no entanto apresentaram-se altamente eficazes na sua redução. Ambos os desinfetantes apresentam ação insatisfatória sobre biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp., especialmente frente aos SCP. Ressalta-se a importância do estabelecimento de programas sanitários a fim de prevenir a formação de biofilmes e a diminuição das fontes de contaminação da glândula mamária nos diferentes sistemas de produção leiteira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altieri K.T., Sanitá P.V., Machado A.L., Giampaolo E.T., Pavarina A.C., Jorge J.H., Vergani C.V. 2013. Eradication of a Mature Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. 24(5): 487-49.
- Amaral L.A., Isa H., Dias L.T., Rossi O.D. & Filho N.F. 2004. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. Pesq. Vet. Bras. 24:173-177.
- Barlow J. 2011. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 16:383-407.
- Boddie R.L., Nickerson S.C. 2002. Reduction of Mastitis Caused by Experimental Challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by Use of a Quaternary Ammonium and Halogen-Mixture Teat Dip. J. Dairy Sci. 85:258-262.
- Clonts L. 2008. Como evitar a formação de biofilmes. Revista Controle de Contaminação. 109: 50-56.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. 1995. Microbial Biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49:711-45.
- Edinger D., Tenhagen B.A., Kalbe P., Klunder G., Baumgartner B. & Heuwieser W. 2000. Effect of Teat Dipping with a Germicide Barrier Teat Dip in Late Gestation on Intramammary Infection and Clinical Mastitis during the First 5 Days Post-partum in Primiparous Cows. J. Vet. Med. 47:463-468.
- Galton D.M. 2004. Effects of an Automatic Postmilking Teat Dipping System on New Intramammary Infections and Iodine in Milk. J. Dairy Sci. 87:225-231.
- Hall-Stoodley L. & Stoodley P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. Current Opinion in Biotechnology. 13:228-233.
- Lou Q., Qi Y., Ma Y., Qu D. 2014. Two-Component Signal Transduction System SaeRS Positively Regulates *Staphylococcus epidermidis* Glucose Metabolism. The Scientific World Journal. 2014:1-12.
- MacFaddin J.F. 2000. Biochemical Testes for Identification of Medical Bacteria. 3ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 105-117.
- Marques S.C., Rezende J.G.O.S. Alves L.A.F, Silva B.C, Alves E., Abreu L.R., Piccoli R.H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. Brazilian Journal of Microbiology. 38:538-543.
- Medeiros E.S., Santos M.V., Pinheiro J.W.J., 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.

- Millezi F.M., Pereira M.O., Batista N.N., Camargos N., Auad I., Cardoso M.D.G., Piccoli R.H. 2012. Susceptibility of monospecies and dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, 32: 351–359.
- National Mastitis Council. 2004. Recommended protocols for evaluating efficacy of postmilking teat germicides. NMC Annual Meeting Proceedings, p. 280.
- Oliveira M., Bexiga R., Nunes S.F., Carneiro C., Cavaco L.M., Bernardo F. & Vilela C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*. 118:133–140.
- Otto M. 2008. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 322:207–228.
- Pagano P.J., Buchanan L.V., Dailey C.F., Haas J.V., Van Enkb R.A., Gibson J.K. 2004. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23:226–234.
- Pedrini S.C.B., Margatho L.F.F. 2003. Sensibilidade de micro-organismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetante. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*. 70: 391-395.
- 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. 234 p.
- Pyorala S., Taponen S. 2009. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology* 134:3–8.
- Quinn P.J., 1994. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K., Carter G.R. (Eds), *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolfe Publishing, London, p.137-143.
- Ramalho A.C., Soares K.D.A., Silva D.F., Barros M.R.C., Pinheiro J.W.J., Oliveira J.M.B., Mota R.A., Medeiros E.S. 2012. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. *Pesq. Vet. Bras.* 32(12):1285-1288.
- Rodrigues L.B., Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., Oliveira A.P., Goetz F., Nascimento V.P. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:1082-1085.
- Sá M.E.P., Cunha M.L.R.S., Elias A.O. & Langoni C.V.H. 2004. 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*. 41:320-326.
- Santos M.V. & Fonseca L.F.L. 2007. Estratégias para o controle de mastites e melhoria da qualidade do leite. *Manoele, Barueri/SP*, p. 47-64.
- Spinosa H.S., Gorniák S.L., Bernardi M.M. 2002. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 389-394.
- Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Bonaventura G., Djukic S., Cirkovic I. & Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115:891-899.
- Thompson J., Meddens M.J.M., Thorig L., Van Furth R. 1982 The Role of Bacterial Adherence in the Pathogenesis of Infective Endocarditis. *Infection* 10, n.3, p. 196-198.
- Varhimo E., Varmanen P., Fallarero A., Skogman M., Pyorala S., Iivanainen A., Sukura A., Vuorela P., Savijoki k. 2011. Alpha- and b-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*. 149:381–389.
- Vermelho A. B., Bastos M.C.F.B., Sá M.H.B. 2007. *Bacteriologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 50.
- Wang H., Ding S., Wang G., Xu X., Zhou G. 2013. In situ characterization and analysis of Salmonella biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology* 167:293–302

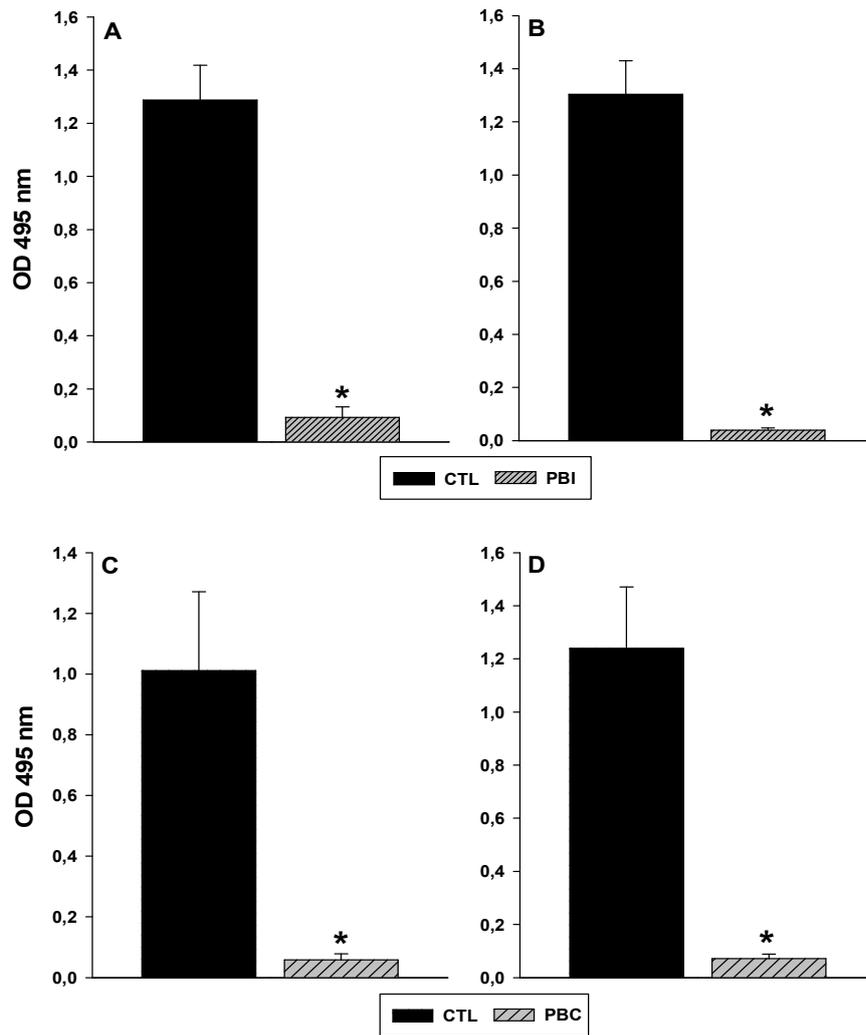


Figura 1. Atividade de produtos a base de iodo (A e B) e clorexidine (C e D) sobre a adesão de SCN (A e C) e SCP (B e D). CTL – controle; PBI – produto a base de iodo; PBC – produto a base de clorexidine. (*) Indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, conforme determinado por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

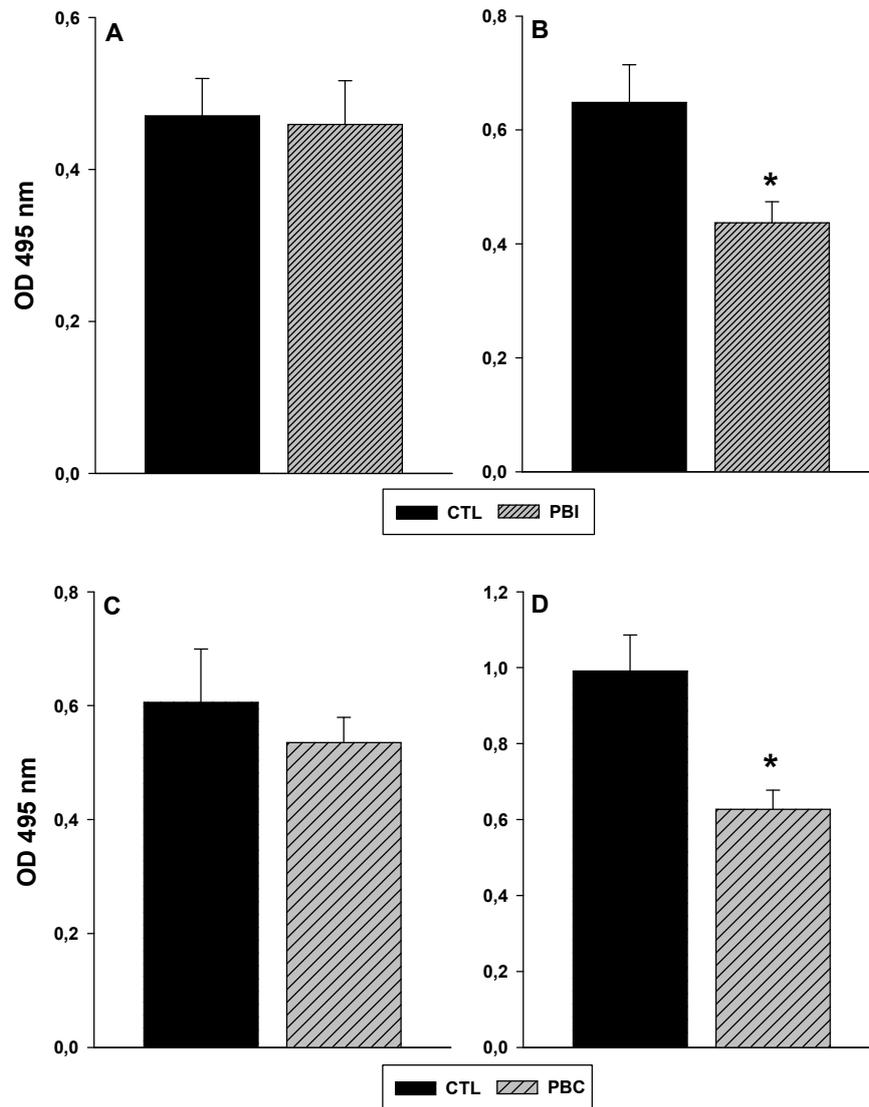


Figura 2. Atividade de produtos a base de iodo (A e B) e clorexidine (C e D) sobre biofilme pré formado de SCN (A e C) e SCP (B e D). CTL – controle; PBI – produto a base de iodo; PBC – produto a base de clorexidine. (*) Indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, conforme determinado por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de produtos pós-*dipping* é uma prática indispensável no manejo de rebanhos leiteiros. No entanto, os produtos a base de clorexidine e iodo podem não impedir a adesão de algumas cepas de *Staphylococcus* spp., e também não possuir a eficácia esperada sobre biofilmes consolidados, embora sua ação sobre células livres tenha sido satisfatória. Dessa forma, salienta-se a importância da aplicação dos produtos testados a fim de prevenir a colonização da glândula mamária por micro-organismos contagiosos, evitando-se assim a contaminação de animais sadios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, F.S. et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.1, p.1-6, 2013.

BASELGA, R. et al. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4857-4862, 1993.

BLODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C. Reduction of Mastitis Caused by Experimental Challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by Use of a Quaternary Ammonium and Halogen-Mixture Teat Dip. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.258–262, 2002.

CHEN, L.; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infectious and control strategies. **Int J Oral Sci**, v. 3, p. 66-73, 2011.

CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. **Revista Controle de Contaminação**, v.109, p.50-56, 2008.

DIVERS, T.J; PEEK, S. F. **Rebhun's diseases of dairy cattle**. St. Louis: Saunders, p. 156 – 162; 608 - 610, 2008.

EDINGER, D. et al. Effect of Teat Dipping with a Germicide Barrier Teat Dip in Late Gestation on Intramammary Infection and Clinical Mastitis during the First 5 Days Postpartum in Primiparous Cows. **J. Vet. Med**, v.47, p.463-468, 2000.

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

GALTON, D.M. Effects of an Automatic Postmilking Teat Dipping System on New Intramammary Infections and Iodine in Milk. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.225–231, 2004.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre: Artmed, p.189-193, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **TRENDS in Microbiology**, v.13, p.7-10, 2005.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v.20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.

JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY Y.D.N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Anim Health Res Rev**, v. 11, n.2, p. 97-121, 2010.

LADEIRA, S.R.L. Mastite Bovina. In: Riet-Correa, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol 1. 3. ed. Santa Maria: Palotti, 2007.

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

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 398–407, 2006.

OLIVEIRA, M. et al. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 187-191.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 55-59.

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

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

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMOJOKI, H. et al. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 344–352, 2012.

SONGER, J.G.; POST, K.W. **Veterinary Microbiology**: bacterial and fungal agents of animal disease. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. Cap. 4, p.35-42.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v.115, p.891-899, 2007.