



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**Caracterização molecular, fenotípica e análises de biofilme
em *Staphylococcus aureus* isolados do leite de mastite
bovina**

ALICE MARTINS DA SILVA

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF
JUNHO - 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**Caracterização molecular, fenotípica e análises de biofilme
em *Staphylococcus aureus* isolados do leite de mastite
bovina**

ALICE MARTINS DA SILVA

ORIENTADOR: JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA
VETERINÁRIA**

LINHA DE PESQUISA: MEDICINA PREVENTIVA

BRASÍLIA/DF
JUNHO - 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

Caracterização molecular, fenotípica e análises de biofilme em *Staphylococcus aureus* isolados do leite de mastite bovina

Alice Martins da Silva

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE SAÚDE ANIMAL COMO
PARTE DOS REQUISITOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE
ANIMAL.

Aprovado por:

José Renato Junqueira Borges, Prof. Dr. UnB.
(Orientador):

Simone Perecmanis, Prof. Dra., UnB
(Examinadora Interna):

Angela Patrícia Santana, Prof. Dra., UnB.
(Examinadora Interna):

Fabício Souza Campos, Prof. Dr., UFRGS.
(Examinador Externo):

Paula Suzana Elisa Maciel Poll, Prof. Dra.
(Examinadora Externa)

Brasília - DF, 9 de junho de 2025.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Silva, A. M. **Caracterização molecular, fenotípica e análises de biofilme em *Staphylococcus aureus* isolados do leite de mastite bovina**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 92p. Tese de doutorado.

Documento formal autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos. Foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Carlos Newton da Silva (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os Professores que estiveram presentes em minha caminhada acadêmica durante esses anos de graduação, residência, mestrado e doutorado. Particularmente a Prof. Dra. Simone Perecmanis, Prof. Dr. José Renato, Prof. Dra. Lígia Cantarino, Prof. Dr. Fabrício Campos, Prof. Dra. Ângela Patrícia e Prof. Dr. Fabiano Sant’Ana. O meu muito obrigada pelos ensinamentos, oportunidades, críticas, puxões de orelha, e boas lembranças. Tenho por todos muito carinho e admiração além do exemplo como seres humanos e profissionais dedicados a Medicina Veterinária e a Ciência.

À MSc. Muriel Guedes pelos ensinamentos a campo e amostras remetidas ao laboratório. Ao Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago pela ajuda no tratamento dos dados desse trabalho.

Agradeço a todos da equipe do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária que participaram desse trabalho direta ou indiretamente. Um agradecimento especial ao Médico Veterinário Rômulo Salignac e ao estudante de iniciação científica Gabriel Saraiva por me auxiliarem de forma primorosa em meu experimento.

Ao meu parceiro de vida, Juliano Pereira Terra pela compreensão nos momentos de ausência e por acreditar tanto em mim e sempre me incentivar a ser melhor. Seu apoio e presença foram fundamentais para que eu persistisse e vencesse os obstáculos que surgiram ao longo do caminho.

À minha filha Helena Maria por ser minha fonte de alegria, entusiasmo, amor e me fazer querer ir sempre mais longe.

Aos meus pais, Ariane Abrunhosa da Silva e Luiz Martins da Silva e família por todo amor, apoio e incentivo. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Aos colegas de pós graduação do PPGSA, por todo o período de convívio e aprendizados compartilhados. Também, às agências de fomento FAP/DF e Capes pela bolsa concedida e a todos professores, técnicos e terceirizados da Universidade de Brasília.

RESUMO

RESUMO: O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes responsáveis por ocasionar mastites em vacas leiteiras. Esse patógeno é responsável por prejuízos econômicos significativos devido à redução na qualidade e quantidade de leite produzido. Além dessas perdas, essas bactérias possuem potencial patogênico, são amplamente resistentes a antimicrobianos e capazes de produzir biofilme no úbere bovino e em equipamentos. Também, o uso indiscriminado e desnecessário de antibióticos no tratamento dessa enfermidade pode resultar em efeitos residuais no leite, ocasionando riscos à Saúde Pública. O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o perfil molecular e fenotípico com relação a resistência a antimicrobianos, capacidade de produção de biofilme e presença de genes de bomba de efluxo em 35 isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite cru de mastites clínicas e subclínicas no Distrito Federal e sua Região Integrada de Desenvolvimento. Para isso, as amostras foram confirmadas bioquimicamente e por biologia molecular pela presença dos genes específicos *nuc* e *aroA*. Para a avaliação do perfil de resistência, foram avaliados 20 antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar (n=35) e testados os seguintes genes de resistência: *mecA*, *blaZ*, *van(A)*, *tet(M)*, *tet(K)*. Para a investigação de produção de biofilme foram utilizados o ágar vermelho congo, ensaio de adesão em microplaca e PCR para os genes *icaA*, *icaD* e *bap*. Ainda, foram testados os genes *mrs(A)*, *tet(38)*, *nor(A)* e *qacA* para a avaliação de bombas de efluxo e resistência a desinfetantes. Como resultados obtidos, a análise do perfil de resistência antimicrobiana mostrou maior resistência (71,42%) às bases farmacológicas linezolida, seguida por penicilina G (60%) e tetraciclina (37,14%). Entre os isolados, 21/35 (60%) foram classificados como resistentes a múltiplas drogas. Os genes amplificados com maior frequência foram *blaZ* (88,5%), seguido por *tet(K)* (31,4%) enquanto o gene *mecA* não foi detectado. Observou-se que no ensaio com o ágar vermelho congo 21,42% foram capazes de produzir biofilme. Enquanto pelo método de adesão em placa, 100% dos isolados produziram biofilme sendo classificados em 3 categorias: 39,39% foram capazes de produzir biofilme fortemente, 30,30% moderadamente e 27,27% fracamente. O gene *icaA* esteve presente em 33,33%, o gene *icaD* em 90,90% enquanto o gene *bap* apenas em 9,09% das amostras avaliadas. Dentro dos genes relacionados ao efluxo os genes *tet(38)* e *nor(A)* foram os mais frequentemente amplificados com 80% e 62,8% respectivamente. A capacidade de formar biofilme e a resistência antimicrobiana observados em alguns isolados neste trabalho destacam a importância de estudar e monitorar as cepas locais *in vitro*.

Palavras-chave: mastite, biofilme, resistência a antimicrobianos, bomba de efluxo.

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is one of the main agents responsible for causing mastitis in dairy cows. This pathogen is responsible for significant economic losses due to the reduction in the quality and quantity of milk produced. In addition to these losses, these bacteria have pathogenic potential, are widely resistant to antimicrobials and can produce biofilm on the bovine udder and on equipment. In addition, the indiscriminate and unnecessary use of antibiotics to treat this disease can result in residual effects in the milk, causing risks to public health. The general objective of this study was to analyze the molecular and phenotypic profile in relation to antimicrobial resistance, biofilm production capacity and the presence of efflux pump genes in 35 *S. aureus* isolates obtained from raw milk samples of clinical and subclinical mastitis in the Federal District and its Integrated Development Region. To do this, the samples were confirmed biochemically and by molecular biology for the presence of the specific genes *nuc* and *aroA*. To assess the resistance profile, 20 antimicrobials were evaluated using the agar disk diffusion method (n=35) and the following resistance genes were tested: *mecA*, *blaZ*, *van(A)*, *tet(M)*, *tet(K)*. Congo red agar, microplate adhesion assay and PCR for the *icaA*, *icaD* and *bap* genes were used to investigate biofilm production. The *mrs(A)*, *tet(38)*, *nor(A)* and *qacA* genes were also tested to assess efflux pumps and resistance to disinfectants. As a result, the analysis of the antimicrobial resistance profile showed greater resistance (71.42%) to the pharmacological bases linezolid, followed by penicillin G (60%) and tetracycline (37.14%). Among the isolates, 21/35 (60%) were classified as Multiple Drug Resistance. The most frequently amplified genes were *blaZ* (88.5%), followed by *tet(K)* (31.4%), while the *mecA* gene was not detected. It was observed that in the red congo agar test 21.42% were able to produce biofilm. Using the plate adhesion method, 100% of the isolates produced biofilm and were classified into 3 categories: 39.39% were able to produce biofilm strongly, 30.30% moderately and 27.27% weakly. The *icaA* gene was present in 33.33%, the *icaD* gene in 90.90% and the *bap* gene in only 9.09% of the samples evaluated. Among the efflux-related genes, the *tet(38)* and *nor(A)* genes were the most frequently amplified with 80% and 62.8% respectively. The ability to form biofilm and the antimicrobial resistance observed in some isolates in this study highlight the importance of studying and monitoring local strains *in vitro*.

Key words: mastitis, biofilm, antimicrobial resistance, efflux pump.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: Micrograma
AroA : Gene espécie-específico do *Staphylococcus aureus*
AS: Ágar Sangue
ATCC: American Type Culture Collection
Bap: Proteína associada ao biofilme
BHI: Infusão cérebro-coração
blaZ: Gene de resistência à penicilina
BrCAST: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CBT: Contagem bacteriana total
CCS: Contagem de células somáticas
CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute
CMT: Californian Mastit Test
CoA: Gene da coagulase
CPP: Contagem Padrão em placas
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
Dnase: Desoxirribonuclease
eDNA: DNA extracelular
EAM: Ensaio de aderência em microplaca
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EPS: substâncias poliméricas extracelulares
LA-MRSA: Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
LuKM: gene produtor de leucocidina
mecA: Gene de resistência à meticilina
mg: Miligrama
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina
MH: Müller-Hinton
MicroMedVet: Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária
Min: Minuto
mL: Mililitro
MO: Microrganismo
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* susceptíveis à meticilina
MSCRAMMs: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MSL-B: macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B
MDR: Multiple drug resistance
Pb: Pares de base
Nuc: gene da termonuclease
PIA: polissacarídeo de adesão intercelular
PBP: Penicillin Binding Protein
PCR: Reação em cadeia da polimerase
RNA: Ácido Ribonucleico
RIDE: Região Integrada de Desenvolvimento Econômico
SCP: *Staphylococcus Coagulase Positiva*
SCN: *Staphylococcus Coagulase Negativo*
TetK: Gene de resistência à tetraciclina K
TetM: Gene de resistência à tetraciclina M
TSST-1: Toxina da síndrome do choque Tóxico 1

UI: Unidade Internacional

VanA: Gene de resistência à vancomicina A

VanB: Gene de resistência à vancomicina B

VRSA: Staphylococcus resistente a vancomicina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Tipos de mastite.....	20
Figura 2. Exopolissacarídeo PIA/PNAG.....	34
Figura 3. Ensaio de aderência de <i>Staphylococcus aureus</i> em microplaca.....	36

CAPÍTULO II

Figura 1. Desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	51
Figura 2. Infecção no úbere bovino por <i>Staphylococcus aureus</i>	54

CAPÍTULO III

Figura 1. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> no meio Ágar Vermelho Congo após 24hrs.....	80
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Primers utilizados na caracterização genotípica de <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Tabela 2. Frequência relativa da resistência antimicrobiana entre <i>Staphylococcus aureus</i> isolados do Distrito Federal, Brasil, utilizando o teste de susceptibilidade por disco difusão.....	79
Tabela 3. Dados sobre perfil de resistência antimicrobiana, capacidade de formação de biofilme, genes relacionados a resistência, biofilme, bombas de efluxo e coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina no Distrito Federal.	91

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. CAPÍTULO I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1. Bovinocultura leiteira regional.....	18
3.2. Mastite.....	19
3.3. Diagnóstico.....	21
3.4. Ferramentas de controle e tratamento.....	23
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.6. Resistência antimicrobiana e mecanismos moleculares de resistência em <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.6.1. Mecanismos de efluxo.....	29
3.7. Fatores de virulência e toxinas.....	32
3.8. Formação de biofilme por <i>Staphylococcus aureus</i> e genes envolvidos.....	33
4.REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO II. ARTIGO CIENTÍFICO I.....	46
Biofilmes bacterianos e suas implicações na mastite bovina.....	46
Resumo.....	47
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	49
Resultados e discussão.....	49
Patógenos formadores de biofilme na mastite bovina.....	49
Fases na formação do biofilme: aderência inicialmente.....	50
Produção da matriz extracelular.....	51
Desprendimento e dispersão.....	52
Aderência, Invasão e formação de biofilme na glândula mamária.....	53
Biofilmes no aumento da resistência antimicrobiana.....	54
Impacto de biofilmes na bovinocultura leiteira.....	56
Métodos de detecção e diagnóstico de biofilmes.....	58
Terapias alternativas para o controle de biofilmes.....	60
Discussão e conclusão.....	62
Referências.....	64
CAPÍTULO III. ARTIGO CIENTÍFICO II.....	70
Abstract.....	72
Introduction.....	72
Material and Methods.....	74
Bacterial strains.....	74
Resistance to antimicrobials.....	74
DNA isolation, Polymerase Chain Reaction (PCR)and genotypic characterization.....	75
Qualitative and quantitative biofilm assay.....	76
Statistical analyzes.....	77
Results.....	77

Antimicrobial Susceptibility Testing.....	77
Evaluation of biofilm formation capacity: phenotypic and genotypic analysis.....	79
Discussion.....	80
Conclusions.....	84
References.....	85
ANEXO I.....	91

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento nutritivo, fonte de proteínas, cálcio, fósforo e vitaminas amplamente utilizado na alimentação humana, podendo ser beneficiado e gerar produtos derivados (MÜLLER, T. & REMPEL, C., 2021). A bovinocultura leiteira desempenha um importante papel econômico e social, sendo uma cadeia produtiva bem desenvolvida e organizada no Brasil, sendo que, de acordo com o Food and Agriculture Organization of the United Nations, o país classifica-se como o quarto maior produtor mundial de leite. Os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Santa Catarina destacam-se como os maiores produtores nacionais (EMBRAPA, 2022; FAO, 2025; IBGE, 2023).

Dentre os principais desafios enfrentados na produção de leite no Brasil ressaltam-se a heterogeneidade e o caráter disperso dos produtores leiteiros, o que determina uma demanda por tecnificação, melhoria no manejo e gestão (EMBRAPA, 2022). Além disso, a qualidade e quantidade do leite produzido são influenciadas por diversos fatores como alimentação, potencial genético e manejo dos rebanhos e também aspectos técnicos como refrigeração, armazenamento e transporte do insumo (MÜLLER, T. & REMPEL, C., 2021).

Dentro das dificuldades relacionadas aos animais, a sanidade da glândula mamária é um dos principais desafios do produtor e da indústria leiteira. A ocorrência de inflamações e infecções mamárias, denominadas mamites ou mastites, são responsáveis por gerar uma infecção dolorosa e debilitante às fêmeas lactantes, afetando e reduzindo seu bem-estar, considerável diminuição na quantidade e na qualidade do leite produzido, ocasionando perda de indicadores de qualidade como CCS, CBT, CPP entre outros, o que muitas vezes inviabiliza sua comercialização e beneficiamento (ADKINS et al., 2018; CHENGheng & HAN., 2020).

As mastites são classificadas em ambientais e infecciosas, sendo a segunda a de maior preocupação para o produtor, pelo risco de transmissão a outros animais e desenvolvimento de infecções subclínicas. Um dos principais agentes envolvidos na mastite infecciosa e subclínica é a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* (RUEGG et al., 2017; PÉREZ et al., 2020). Essa bactéria é comumente encontrada na pele, sistema respiratório de humanos e animais, estando também presente no meio ambiente. Sua ação torna-se preocupante quando invade e coloniza tecidos em que geralmente não predomina como o úbere bovino (Pedersen et al., 2021). Dentro desse ambiente, estirpes com potencial patogênico são capazes de colonizar e expressar fatores de virulência que permitem a colonização do tecido do hospedeiro, a produção de toxinas, maior resistência a fagocitose, adesão à célula hospedeira, formação de

biofilmes, e evasão do sistema imunológico, entre outras ações (PÉREZ et al., 2020; PEDERSEN et al., 2021; CAMPOS et al., 2022).

Além dos fatores de virulência expressos durante a colonização e também na defesa do microrganismo, o *S.aureus* possui outros mecanismos biológicos que permitem sua resistência e persistência no hospedeiro (BAKERMA et al., 2006). A resistência antimicrobiana caracteriza-se pela habilidade de uma bactéria sobreviver a uma droga e conseguir replicar-se posteriormente. Esse é um processo que ocorre naturalmente ao longo do tempo, usualmente devido a modificações genéticas adquiridas por mutações e seleções, ou adquiridas por transferências genéticas entre microrganismos (BALABAN et al., 2019; PÉREZ et al., 2020). Dentre esses mecanismos pode-se citar genes de resistência antimicrobianos como os genes *blaZ*, *mecA*, *mecC*, que possibilitam resistir aos antimicrobianos beta -lactâmicos, *tet(K)* e *tet(M)* a tetraciclina, *msr(A)* a macrolídeos, entre outros (PÉREZ et al., 2020). Essa múltipla resistência ocasionada pelo uso incorreto de antibióticos, há décadas preocupa pesquisadores e profissionais da saúde animal e humana. Estirpes multirresistentes como os *S.aureus* meticilina resistentes (MRSA), encontrados há décadas apenas em ambientes hospitalares já são observados em vários locais externos, como em sistemas de produção animal, sendo chamados de MRSA associados a produção (Livestock-Associated MRSA), ocasionando apreensão pelo risco de contaminação do ambiente e da cadeia alimentar envolvida (CUNY et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Outros mecanismos de defesa não relacionados a genes de resistência também são observados nos *S.aureus* como as bombas de efluxo, a formação de biofilme e a produção de toxinas. Essas características vêm sendo mais frequentemente estudadas, pois permitem ao microrganismo permanecer em seu hospedeiro mesmo após eventos estressantes como tratamentos prolongados com antibióticos. Esse fenômeno é denominado persistência a antibióticos ou persistência. Tais eventos permitem que populações inteiras ou subpopulações clonais permaneçam no hospedeiro após tratamentos com drogas eficazes (BALABAN et al., 2019).

Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar e analisar os principais mecanismos biológicos de persistência e resistência de *S. aureus* isolados de mastites de vacas oriundas do Distrito Federal e de sua Região Integrada de Desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus aureus* de vacas com mastite no Distrito Federal e RIDE, com foco em genes de resistência, biofilme e bombas de efluxo, visando compreender a etiopatogênese da doença na região geográfica de estudo.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar fenotipicamente a capacidade de *S. aureus* em formar biofilme pela técnica de aderência em microplaca e pelo meio Ágar Vermelho Congo.
- Investigar a presença de genes associados a formação de biofilme em *S. aureus* (*icaA*, *icaD* e *bap* genes).
- Examinar o perfil de resistência a antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar.
- Pesquisar a presença dos principais genes envolvidos no processo de resistência de *S. aureus* (*mecA*, *blaZ*, *tet(M)*, *tet(K)*, *van(A)*).
- Estudar a presença dos genes *mrsA*, *tet(K)*, *tet(38)*, *nor(A)* e *qacA* associados aos mecanismos de efluxo.
- Avaliar a presença do gene de virulência *CoA*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bovinocultura leiteira regional.

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de leite, estando atrás somente de países como Índia, Estados Unidos e China. Em 2024, foram produzidos mundialmente 979 milhões de toneladas sendo 36.436.492 de toneladas produzidas no Brasil. Minas Gerais destaca-se como o Estado mais produtivo seguido por Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Goiás. (FAO., 2025; IBGE, 2025).

O Estado de Goiás destaca-se como o maior estado produtor de leite na região Centro-Oeste com uma produção de 2.999.571 toneladas no ano de 2022. Entre seus municípios mais produtivos destacam-se Cristalina, Luziânia e Corumbá de Goiás, membros da Região Integrada de Desenvolvimento (RIDE) que também participam no abastecimento do Distrito Federal (IBGE, 2025).

Dados da Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal (SEAGRI-DF) e da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal (EMATER-DF) apontam que o Distrito Federal (DF) em seu território com área de 5.761 km² possui 2571 propriedades rurais dedicadas à criação de bovinos, com um rebanho de 84.248 animais (SEAGRI-DF, 2023), sendo desses 1739 produtores voltados para a bovinocultura leiteira com um rebanho estimado em 32.756 animais. A produção de leite é utilizada principalmente para consumo próprio in natura e/ou como derivados lácteos como o queijo e venda do excedente (EMATER-DF, 2024).

No Distrito Federal poucas propriedades rurais possuem rebanhos especificados para a bovinocultura leiteira. Em sua maioria, os rebanhos são mistos e constituídos por um pequeno número de animais, com uma média de 19 animais por produtor. Dentro desse número de produtores, destacam-se alguns projetos baseados no confinamento de animais como Compost Barn e ou Freestall. Esses são responsáveis por produzirem a maior parte do volume total de litros de leite da região (51,97%) equivalendo apenas a 5,97% do total de produtores cadastrados (EMATER-DF, 2024).

Com relação a pesquisas e estudos científicos, existe um maior predomínio de publicações relacionadas às mastites bovinas nas regiões nordeste e sudeste (ACOSTA et al., 2016). Apesar do quantitativo de leite produzido na região Centro-Oeste brasileira, poucos estudos relacionados a prevalência, características fenotípicas, moleculares ou epidemiológicas dos principais agentes etiológicos envolvidos em casos de mastite na região foram publicados

até o ano de 2025 (FREITAS, F. A, 2014; ACOSTA et al., 2016; CARVALHO et al., 2021; VIEIRA et al., 2021).

3.2 Mastite

A mastite é definida como um processo inflamatório da glândula mamária em mamíferos, podendo ser ocasionada por traumas, irritação química ou infecção por microrganismos como bactérias, vírus, fungos e algas, sendo as bactérias os agentes mais relacionados a enfermidade (PÉREZ et al., 2020; WELLENBERG et al., 2002). Essa enfermidade acompanha o desenvolvimento da pecuária leiteira e o costume do ser humano em ordenhar vacas para obter o leite como alimento. Seus primeiros relatos ocorreram em 1917 (BREED and BREW, 1917; RUEGG, P. 2017) onde os autores preocupavam-se com os possíveis riscos à saúde pública pela alta contagem bacteriana no leite cru.

Muitos avanços ocorreram com a descoberta de agentes etiológicos, e o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, métodos preventivos e na forma de se organizar e classificar a mastite. Entretanto, essa doença ainda permanece como um dos principais desafios dentro da produção leiteira (RUEGG, P., 2017). Seu desenvolvimento depende de diversos fatores, que vão além do simples envolvimento de um agente etiológico. A idade da vaca, número de lactações, estirpe do microrganismo, ambiente, manejo, anatomia e imunidade da vaca influenciam diretamente na ocorrência da infecção e no desenvolvimento ou cura da doença (BARKEMA et al., 2006).

A mastite inicia-se pela invasão bacteriana da glândula mamária por meio do canal do teto. Bactérias podem entrar na glândula pela colonização da pele da glândula mamária ou do teto entre as ordenhas, por refluxo de leite nas teteiras, quando o vácuo do equipamento está mal calibrado ou com uso de cânulas intramamárias contaminadas. Falhas anatômicas nos tetos, hiperqueratose, ou incompleto fechamento do esfíncter do teto são alguns fatores de risco para o desenvolvimento da enfermidade (CHEG & HAN., 2020; SANTOS et al., 2019).

A mastite recebe diferentes classificações, podendo ser organizada de acordo com a forma de apresentação, agente etiológico e tempo de duração da infecção. Durante a inflamação, o animal pode ou não apresentar sinais clínicos, classificando-se a mastite em clínica, quando ocorrem sinais evidentes de inflamação como a presença de grumos ou sangue no leite, endurecimento do úbere, dor a palpação da glândula mamária, apatia e febre (ADKINS et al., 2018).

Alguns patógenos desenvolveram ao longo de sua evolução a capacidade de se

adaptarem à glândula mamária e não serem ou serem reconhecidos fracamente pelo sistema imunológico, gerando uma infecção mais branda, sem sinais clínicos evidentes, classificando-se assim esse tipo de mastite como subclínica, como pode ser visto na Figura 1. Essa apesar de não ocasionar sinais evidentes, a mastite subclínica altera padrões físico-químicos como a Contagem de Células Somáticas (CCS) e padrões microbiológicos, o que compromete e reduz a qualidade do leite produzido (CHENG & HAN., 2020).

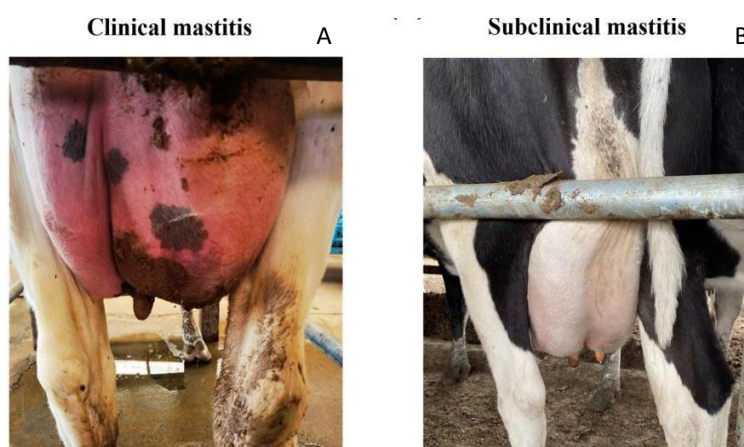


Figura 1. Tipos de mastite. A. Mastite clínica com apresentação de sinais clínicos como aumento de volume e rubor. B. Mastite suclínica, sem sinais clínicos evidentes (Zuo et al., 2024).

As mastites ainda podem ser classificadas em ambientais e contagiosas. Mastites ambientais envolvem microrganismos presentes no ambiente, como em camas e locais de alojamento do rebanho. Esses agentes possuem diferentes origens, sendo considerados patógenos oportunistas, como as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.) e os estreptococcus ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus canis*, *Enterococcus* spp.) (RUEGG et al., 2017). O controle de mastites ambientais é realizado pelo correto manejo pós - ordenha (tempo adequado do fechamento do esfíncter do teto), higiene das instalações e vacinação (CHENG & HAN., 2020).

Mastites contagiosas envolvem microrganismos que possuem uma origem em comum, ou seja, são transmitidos entre vacas ou entre os quartos mamários durante a ordenha. As principais fontes de contaminação são: equipamentos mal higienizados, mãos de ordenhadores, bezerros que mamam em diferentes vacas, presença de moscas, utensílios como panos usados em comum, entre outros. As principais bactérias responsáveis por mastites contagiosas são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus coagulase negativa*,

Mycoplasma spp (SANTOS et al.,2019).

Esses patógenos geralmente também estão envolvidos em infecções subclínicas com aumentada CSS. Seu controle pode ser realizado com uma correta desinfecção dos tetos pós ordenha, higiene dos equipamentos, segregação dos animais positivos, descarte de animais com infecções crônicas e terapia de vaca seca (RUEGG, P., 2018; CHENG & HAN., 2020).

3.3 Diagnóstico

O diagnóstico da mastite é realizado inicialmente através de um exame físico detalhado do animal, onde alterações no úbere ou no leite podem ser observadas, junto com possíveis sinais clínicos como hipertermia, perda de apetite ou apatia. Um conjunto de técnicas realizadas a campo ou em laboratório podem auxiliar na determinação do diagnóstico. Em geral, esse grupo consiste de metodologias que se baseiam na observação da inflamação (caneca de fundo escuro, california mastitis test, contagem de células somáticas, aumento de enzimas específicas, redução na lactose, pesquisa por proteínas de fase aguda, aumento na condutividade elétrica do leite), e que para caracterizarem uma infecção devem ser realizadas em conjunto com técnicas que envolvam a pesquisa do agente infeccioso (ADKINS et al., 2018; ASHRAF & IMRAN., 2018). Se tratando de abordagens diagnósticas a campo, o uso da caneca de fundo escuro, onde é possível observar a presença de grumos e alterações nos primeiros jatos de leite é uma ferramenta de baixo custo e de rápido e fácil manuseio, que permite a visualização de alterações no leite e o acompanhamento de mastites clínicas. Para mastites subclínicas o California Mastitis Test (CMT) (SCHALM & NOORLANDER, 1957) é uma técnica adequada para realização de testes de triagem de fácil manuseio e baixo custo. O CMT consiste em lisar as células do leite com um detergente (sodium alkyl aryl sulfonate), com objetivo de visualizar a formação de um gel de acordo com a quantidade de material genético liberado. Essa mistura adquire uma aparência viscosa, o que possibilita classificar a mastite +, ++, +++ ou ++++ de acordo com o aspecto do composto formado (SCHALM & NOORLANDER, 1957; ADKINS et al., 2018; ASHRAN & IMRAN., 2018).

A nível laboratorial, um bom indicador de infecção intramamária é a quantificação por citometria de fluxo de células somáticas (CCS) presentes nos quartos mamários ou em amostras de tanque (ASHRAF & IMRAN., 2018). A CCS é composta por células leucocitárias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eritrócitos e células epiteliais, onde seu aumento pode demonstrar a instalação de um processo inflamatório (CHENG & HAN., 2020). Valores acima de 200.000 céls/mL caracterizam um processo inflamatório que em algumas situações

fisiológicas, como a involução da glândula mamária, podem não determinar um quadro de mastite (ASHRAF & IMRAN., 2018).

Para o diagnóstico de infecção intramamária é importante a pesquisa do agente infeccioso, pois o diagnóstico precoce é decisivo e fundamental para o sucesso no tratamento (LEÃO et al., 2015). Com esse objetivo, a cultura microbiológica e a reação em cadeia da polimerase podem ser utilizadas para a identificação de microrganismos e de possíveis genes de resistência e toxicidade. Visando a utilização de técnicas mais específicas, rápidas e efetivas para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da mastite bovina, técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas em diagnósticos microbiológicos na identificação dos agentes (ZSCHÖCK et al., 2005).

A cultura microbiológica é uma ferramenta útil e atualmente de baixo custo, tornando possível identificar a maioria dos agentes aeróbios envolvidos em quadro de infecções intramamárias (SANTOS & FONSECA, 2017). Esse achado em conjunto ao antibiograma auxilia na decisão do protocolo de tratamento que deve ser instituído, visando o controle e a prevenção da disseminação de patógenos contagiosos e na tomada de decisões que precisam ser implementadas na fazenda. Sendo a escolha correta de qual antibiótico é eficaz no tratamento do agente isolado, fundamental para o sucesso do tratamento (BELOTI et al., 2015). Apesar de ser considerada o padrão ouro para o diagnóstico de agentes, a cultura microbiológica tem como pontos limitantes o período longo requerido para a análise de algumas bactérias e o risco de falsos negativos. Ainda também, apesar de diversos microrganismos crescerem no meio ágar sangue, alguns microrganismos como o *Mycoplasma* spp. e a *Corynebacterium* spp. requerem meios específicos e uma rigorosa padronização laboratorial para o seu diagnóstico (QUINN et al., 2019).

Antigamente, a cultura microbiológica somente era realizada em laboratórios especializados, o que dificultava seu emprego devido a longas distâncias da fazenda ao laboratório, tempo de realização e o custo da análise. Recentemente, processos de cultivo microbiológico foram adaptados e simplificados de forma que pudessem ser realizados dentro da fazenda com uma infraestrutura básica, criando uma tendência para a realização do diagnóstico microbiológico dentro da propriedade, ocasionando benefícios como rapidez no diagnóstico, possibilidade de classificar a mastite em ambiental ou infecciosa e adoção de tratamento mais adequado (LAGO et al., 2008). Esses Kits comerciais receberam a denominação “On-farm” permitindo uma análise prévia e ampla de quais agentes patogênicos podem estar envolvidos no desenvolvimento da mastite na propriedade (ADKINS et al., 2018;

ASHRAF & IMRAN., 2018). GENDA et al. (2016) comparou em um amplo estudo as identificações de culturas realizadas em laboratório com metodologia padrão com identificações realizadas com placas cromogênicas de um kit comercial e observou boa sensibilidade (82.3%) e boa especificidade (89.9%) para o teste. Essa informação rápida com relação ao agente etiológico em mastites clínicas, por exemplo, pode reduzir o uso desnecessário de antibióticos sendo uma ferramenta útil na fazenda. (GENDA et al., 2016; RUEGG, P. 2018).

3.4 Ferramentas de controle e tratamento

Estratégias para o controle e a eliminação de patógenos causadores de mastites, principalmente agentes contagiosos como *S.aureus* e *S. agalactie*, de prevenção, monitoramento, diagnóstico e tratamento são importantes e devem ser implantadas nas propriedades (RUEGG, P., 2017).

Ações preventivas como a testagem para agentes infecciosos antes da aquisição de novos animais; treinamento de operadores e estabelecimento de procedimentos operacionais padrões (POPs) para a higienização de equipamentos e instalações antes, durante e após a ordenha, realização de testes de diagnóstico como a caneca de fundo escuro, CMT e CSS, segregação de animais doentes e realização do conceito de linha de ordenha (ordenar quais animais serão ordenhados primeiro e deixar os animais em período de transição entre colostro e leite, em tratamento ou doentes por último), são algumas medidas não terapêuticas que auxiliam na detecção da enfermidade, e reduzem o risco e a disseminação de patógenos dentro do rebanho (RUEGG, P., 2018; CHENG & HAN., 2020).

Em situações em que o tratamento terapêutico é necessário, algumas informações relevantes, como qual agente etiológico está causando a doença, idade da vaca, número de lactações, CCS e fase de lactação devem ser critérios importantes a serem avaliados para determinar a implementação ou não do tratamento e outras medidas de manejo possíveis, como o descarte do animal. Vacas infectadas por *S. aureus*, dependendo de alguns desses fatores apresentam baixa taxa de cura clínica e microbiológica (3%, 16%) de acordo com o tempo de tratamento, enquanto vacas contaminadas por agentes ambientais como a *E. coli* podem apresentar cura espontânea em poucos dias (BARKEMA et al., 2006; RUEGG, P., 2018).

Escolhas como tempo de duração do tratamento, fármaco utilizado e observação de fatores intrínsecos ao animal são pontos importantes no sucesso da terapia. Em infecções por agentes contagiosos, como *S. aureus*, a utilização de terapias combinadas (via sistêmica e

intramamária) por um período estendido (5-8 dias de tratamento) apresentam um aumento na taxa de cura. A escolha por realizar a terapia da vaca seca (tratar no momento da secagem) também é uma alternativa que aumenta a taxa de sucesso no tratamento, sendo esse o melhor período para a resolução de mastites. Em infecções recorrentes e crônicas a escolha pelo descartado animal ou a secagem do teto com iodo, técnica aplicável para animais de alto valor zootécnico, são possibilidades de escolha (BARKEMA et al., 2006; CHENG & HAN, 2020).

Os antimicrobianos são os principais fármacos utilizados para o tratamento da mastite. O uso exagerado e sem critério de antimicrobianos na indústria leiteira preocupa organizações mundiais, como OMS e FAO devido ao risco de desenvolvimento e aumento de resistência a antibióticos disponíveis na saúde humana e animal (FAO, 2023). Entre os microrganismos resistentes a antimicrobianos, destaca-se a espécie *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA – *Staphylococcus aureus* Methicilin-Resistant), que são linhagens não comumente observadas em animais, mas que alguns estudos têm evidenciado casos de infecção em animais domésticos, aquáticos, de produção e também silvestres (Silva et al., 2023).

A escolha adequada de antimicrobianos deve levar em consideração características como a dificuldade do fármaco se difundir e atingir completamente o tecido da glândula mamária, além de apresentar eficácia na eliminação do patógeno, visto que muitos fármacos como os beta-lactâmicos isolados são pouco eficazes em eliminar bactérias gram-positivas e alguns microrganismos como *Mycoplasma* spp., *Prothoteka zopfii* e leveduras são intrinsecamente resistentes a antibióticos (RUEGG, P., 2018; CHENG & HAN, 2020). O monitoramento dos sinais clínicos e das alterações no leite em até sete dias após o tratamento de mastites clínicas também é indicado, sendo que em terapias utilizadas para tratar mastites causadas por *S. aureus*, uma nova cultura microbiológica em dias intervalados (7, 14, 30) dias após o tratamento é uma medida importante para avaliar completa cura clínica e também microbiológica (BARKEMA et al., 2006; RUEGG, P., 2018).

Os usos constantes e indiscriminados de antibióticos têm levado diferentes grupos de profissionais a buscarem por novas alternativas de tratamento das mastites sem o uso de antimicrobianos, como o uso de extrato de plantas como alternativas terapêuticas (POZZO et al., 2011; MILLEZI et al., 2014) e o uso de vacinas direcionadas a agentes específicos (RIBEIRO et al., 2016). Um exemplo é a imunização realizada por vacinas desenvolvidas para determinados agentes etiológicos como *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae* (SCHUKKEN et al., 2011). Ainda, estudos com bacteriófagos (vírus que atacam e lisam bactérias com extrema especificidade) e nanopartículas em combinação com antimicrobianos podem vir a ser

promissoras ideias de tratamento (ALGHARIB et al., 2019; SONG et al., 2024).

O desenvolvimento de imunobiológicos certamente, é objetivo de muitos pesquisadores e de interesse para a indústria. Contudo, a diversidade de agentes responsáveis por ocasionarem mastites e a grande quantidade de diferentes estirpes ainda são os desafios para a produção de vacinas principalmente para agentes gram-positivos. Enquanto para bactérias gram-negativas algumas vacinas baseadas em antígenos altamente conservados do lipolissacarídeo foram eficazes em reduzir a severidade dos sinais clínicos nas mastites ambientais, mas não foram capazes de evitar novas infecções intramamárias (RUEGG, P., 2017; CHENG & HAN, 2020).

3.5 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* spp. compreende mais de 50 espécies, sendo a espécie *S. aureus* certamente a mais estudada por ser responsável por uma diversidade de possíveis afecções bacterianas em humanos e em animais (FETSCH, A., 2018). Esse patógeno recebe essa denominação devido ao seu formato cocóide e por sua típica coloração amarelada que no latim *aurum* significa coloração de ouro ou dourada (ORENSTEIN, A., 2006). Estão presentes principalmente de forma comensal na pele e mucosas, sendo observados no trato digestivo, respiratório e urogenital (McVEY et al., 2016).

Morfológicamente caracterizam-se por terem o formato de cocos e corarem positivamente no teste de gram. Possuem 0.5 a 1.5 µm de diâmetro, não são móveis, não formam esporos e podem ser anaeróbios facultativos. Bioquimicamente são catalase positivos, oxidase negativos e possuem a capacidade de coagular o plasma (coagulase positivo). Apresentam crescimento entre 7°C a 48°C com temperatura ideal de 37°C para seu crescimento e são capazes de se multiplicarem em meios com 5 a 7% de NaCl e reduzidos na atividade de água. Também possuem hemolisinas apresentando hemólise em meios adicionados de sangue (McVEY et al., 2016).

O diagnóstico de *S. aureus* tradicionalmente pode ser realizado por cultivo microbiológico com testes bioquímicos (GANDRA et al., 2005). Nesse teste, características bioquímicas e fenotípicas são analisadas como: presença de hemólise, crescimento em ágar manitol, catalase positiva, capacidade de coagular o plasma e positividade ao teste de DNase (KATETEE et al., 2010). Entretanto, a confirmação desses principais testes não ocorre em todas as ocasiões, o que pode levar a identificações incorretas. Nesses casos, o uso da biologia molecular confirma o diagnóstico com o uso de iniciadores direcionados para regiões do gene

da termonuclease (*nuc*), gene conservado entre as espécies. ou também para o gene *aroA* codificador do produto 5-enolpyruvyl- shikimate-3-phosphate (EPSP) (MARCOS et al., 1999; KATETEE et al., 2010).

Como características moleculares, a espécie *S. aureus* possui um genoma circular único de aproximadamente 2.8 megabases que codifica entre 2592 a 2748 genes, contando com genes conservados e acessórios. Os genes conservados são responsáveis principalmente pelo metabolismo bacteriano correspondendo a 75% do genoma. Enquanto os genes acessórios localizados em elementos genéticos móveis (EGM) como transposons, prófagos, plasmídeos e cassetes, como o Staphylococcal chromosomal cassette mec (SCC*cassete*), permitem a expressão de genes de virulência, resistência e patogenicidade e ocasionam uma variabilidade significativa nos genomas (LINDSAY & HOLDEN, 2004).

Para estudos epidemiológicos moleculares de *S. aureus* em infecções intramamárias em bovinos, diversas técnicas têm sido utilizadas com o objetivo de classificar o isolado e acompanhar a disseminação e possíveis saltos de determinadas linhagens entre diferentes espécies. Como exemplos, técnicas utilizadas como a Multilocus sequence typing (MLST), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e a tipagem da proteína A (*spa*), entre outras (CUNY et al., 2015; NAUSHAD et al., 2020). CAMPOS et al. (2022) ao revisar 79 artigos epidemiológicos que utilizaram MLST e *spa* typing em *S. aureus* observou que o complexo clonal 97 foi o genótipo mais disseminado mundialmente, estando presente em 15 países. No Brasil foram relatados oito diferentes complexos clonais e vinte e seis *spa* types, sendo o 97 o mais observado e caracterizado por ocasionar infecções intramamárias assintomáticas, subclínicas ou infecções persistentes.

Embora essas técnicas auxiliem na tipagem de *S. aureus*, elas não permitem estudar diferenças e detalhes entre linhagens. Com o avanço nas técnicas de sequenciamento genético, é possível compreender e analisar mudanças adaptativas como aquisição ou perda de genes, relações filogenéticas e microevoluções (NAUSHAD et al., 2020; CAMPOS et al., 2022). Como exemplo, temos estudos relacionados a adaptação de linhagens de origem humana que se adaptaram a bovinos; e linhagens envolvidas em infecções intramamárias bovinas que possuem fatores de virulência próprios como o gene *bap* e o gene da toxina LukMF. (PÉREZ et al., 2020; PEDERSEN et al., 2021; CAMPOS et al., 2022).

3.6 Resistência antimicrobiana e mecanismos moleculares de resistência em *S. aureus*.

A utilização clínica dos primeiros antimicrobianos, como o uso da penicilina no ano de 1941 (CHAIN & FLOREY, 1940), trouxe diversos avanços na medicina e na sociedade global. Entretanto, rapidamente bactérias adaptaram-se e ao longo dos anos desenvolveram diferentes mecanismos de resistência como a produção de enzimas que inativam os princípios ativos das drogas, modificações no alvo celular, produção de bombas de efluxo e a limitação na absorção de medicamentos (SINHA et al., 2024).

Inicialmente, os *S. aureus* eram controlados apenas com o uso de penicilinas. Contudo, com o passar dos anos surgiram as primeiras cepas resistentes produtoras de enzimas penicilinases (β -lactamases), capazes de hidrolizar e inativar o anel beta-lactâmico presente nas penicilinas (penicilina G, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas), criando a necessidade da elaboração de novas penicilinas semi-sintéticas como a meticilina. Em *S. aureus*, essas enzimas são codificadas pelo gene *blaZ*, presente em um transposon (Tn552), dentro de um plasmídeo ou no DNA cromossomal bacteriano de cepas humanas e também de animais (FETSH, A., 2018; PÉREZ et al., 2020). Em 1990 ocorrem então as primeiras cepas meticilina resistentes abreviadas como MRSA e MSSA quando sensíveis (FETSH, A., 2018).

Isoladas inicialmente apenas de ambientes hospitalares, essas cepas apresentaram então um diferente mecanismo de resistência às meticilinas relacionado a uma proteína de ligação alterada (PB2a) produzida pelo gene *mecA*. Esse gene localiza-se em um elemento genético móvel chamado de Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec), um elemento móvel capaz de se inserir no cromossomo bacteriano e conferir resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Logo em seguida, com sequência genética semelhante ao gene *mecA* em 69 % o gene *mecC* foi identificado sendo capaz também de gerar resistência a oxacilina e cefoxitina e produzir uma proteína 62% semelhante a PBP2 (FETSH, A. 2018; PÉREZ et al., 2020; SILVA et al., 2023)

Estirpes MRSA apresentam um potencial risco e desafio devido ao reduzido número de antimicrobianos que podem ser utilizados para o tratamento de afecções causadas por esses agentes, sendo classificadas como um dos patógenos de alta prioridade pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2024). Tais cepas, inicialmente encontravam-se apenas em ambientes hospitalares, mas com o tempo se disseminaram para a comunidade e em ambientes de produção de animais, recebendo a denominação de Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA) Tornando-se uma ameaça para veterinários, colaboradores e pessoas que lidam

diretamente com animais (SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2023).

A questão relacionada a resistência antimicrobiana, considerada como um problema antigo, somente cresce e torna-se mais relevante com o passar do tempo. Inserido nesse contexto, LA-MRSA veem constantemente sendo relatados e descritos em diversos países como Reino Unido, Coréia, Alemanha (FEBLER et al., 2010; LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014), entre outros. Diversas espécies, como bovinos, suínos, aves, caprinos e ovinos, lagomorfos, espécies aquáticas e até em espécies silvestres tem apresentado perfis de multirresistência e diversas afecções como mastites, dermatites, abscessos, infecções articulares entre outros prejuízos e riscos sanitários (FETSCH, A., 2018; SILVA et al., 2023).

Como outros mecanismos de resistência comuns em *S. aureus*, podemos citar genes e mecanismos específicos na inativação de determinadas classes de antimicrobianos. A resistência a tetraciclina é ocasionada principalmente por mecanismo de efluxo que reduzem a concentração da droga ou a exportam para fora da célula e por proteção ao alvo de ligação (Pérez et al., 2020). Esses processos são codificados principalmente pelos genes tet (L), tet(K), tet(38). Assim como também na forma de proteção do sítio de ligação com a proteção do ribossomo codificada pelo gene tet(M). Esses genes podem estar sozinhos ou em combinações no mesmo isolado (NARANJO-LUCENA & SLOWEY., 2024).

A resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS-B) é baseada principalmente na modificação do alvo do antimicrobiano. A maioria desses fármacos tem como principal alvo a subunidade 50S do ribossomo bacteriano e atuam bloqueando e inibindo a síntese proteica. Genes como erm (A), erm (B) e erm (C) codificam uma enzima capaz de modificar o sítio de ligação no ribossomo realizando uma metilação o que impede o bloqueio realizado pelos macrolídeos, o que leva a uma resistência combinada aos MLS-B (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022). Também, proteínas de transporte sintetizadas a partir do gene msrA (ABC-family) atribuem resistência aos macrolídeos, principalmente a eritromicina, por mecanismos de efluxo do fármaco. Ainda, os genes mphC (macrolídeos) e InuA (lincosaminas) conferem resistência a essas classes de fármacos por inativação enzimática (FETSCH, A. 2018; PÉREZ et al., 2020; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022)

Aminoglicosídeos são bactericidas amplamente utilizados no tratamento de mastites bovina, na clínica médica veterinária e na medicina. Essa classe tem como principal ação a inibição da síntese proteica agindo na subunidade 30S do ribossomo bacteriano (QUINN, 2019). Os principais mecanismos de resistência desenvolvidos por *S. aureus* são: inativação enzimática e mutações intrínsecas na subunidade 30S. A inativação enzimática ocorre pela ação

de enzimas do tipo transferase (acetiltransferase, phostransferase e, nucleotidiltransferases) codificadas por diferentes genes. O gene *aacA-aphD* demonstra atividade de acetiltransferase e phostransferase atribuindo resistência a gentamicina, tobramicina, amicacina e kanamicina. Enquanto enzimas codificadas pelos genes *aadD* e *aphA3* conferem resistência a kanamicina, neomicina, tobramicina e também a kanamicina, neomicina e amicacina respectivamente (FETSCH, A. 2018; PÉREZ et al., 2020; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Fluoroquinolonas são antimicrobianos utilizados em diversos tipos de afecções em humanos como em animais. São medicamentos que atuam inibindo a replicação bacteriana ao atuarem na inibição das enzimas topoisomerase IV e DNA girase ocasionando um efeito bactericida. Entre os mecanismos moleculares de resistência observados em *S. aureus* podem ser citados mutações nos genes *gyrA*, *gyrB* (DNA girase) e *grr(A)*, *grr(B)* (topoisomerase) onde pequenas trocas de aminoácidos impedem a síntese enzimática (Pérez et al., 2020). Outro mecanismo conhecido é ação de diferentes bombas de efluxo, principalmente da família MFS, codificadas pelos genes cromossomais *nor(A)*, *nor(B)*, *nor(C)*, *sdrM*, *mdeA*, *mepA*, *sepA* e por genes plasmidiais *qacA/B*, *qacG*, *smr* (Pérez et al., 2020; Sinha et al., 2024).

Para o tratamento de MRSA em humanos, em maior parte dos casos são utilizados como últimos recursos os glicopeptídeos, como a vancomicina (MIRZA, H.C., 2017). Esses atuam assim como os beta-lactâmicos, impedindo a síntese da parede bacteriana na inibição da síntese dos peptidoglicanos. A resistência a esses compostos é mais bem descrita em *Enterococcus* spp que apresentam diversos genes de resistência a essa droga. Já se tem conhecimento da transferência de genes de resistência como o operon *van(A)* entre cepas de *Enterococcus* spp. e MRSA (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022). *Staphylococcus aureus* resistentes as vancomicinas recebem a denominação de VRSA e indicam um risco a saúde pública. Como mecanismo molecular de resistência, são sintetizadas a partir do operon *van(A)* moléculas, D-Ala-D-lactate ao invés de D-Ala-D-Ala, o que reduz a ligação de glicopeptídeos aos compostos da parede celular (MIRZA, H.C., 2017; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

3.6.1 Mecanismos de efluxo:

Bactérias utilizam as bombas de efluxo em suas membranas de forma fisiológica para manterem sua homeostase (SINHA et al., 2024). O mecanismo de efluxo utilizado é uma ferramenta celular para a expulsão gradativa de substâncias que causem estresse celular, medicamentos ou desinfetantes que possam ser tóxicos ou prejudiciais. Esse mecanismo atua

também como uma forma de resistência intrínseca ou adquirida a diferentes classes de antimicrobianos ao eliminarem e reduzirem a concentração de uma determinada droga dentro da bactéria impedindo sua ação, sendo um dos mecanismos chave em bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) (PIDDOCK et al., 2006; COSTA et al., 2013).

Essas proteínas são ubíquas nas bactérias e podem ser codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos e localizam-se entre a membrana externa e o citoplasma em gram negativas e entre a camada de peptídeoglicano e o citoplasma em gram positivas (WEBBER & PIDDOCK, 2003; SINHA et al., 2024). Existem bombas de efluxo que carregam diversas substâncias, definidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (multiple drug resistance – MDR) e existem as que transportam substratos específicos, o que confere uma resistência específica (WEBBER & PIDDOCK, 2003). Ainda, diversas famílias de bombas de efluxo e genes que as coordenam já foram descritos com suas ações se baseando em dois sistemas energéticos: um caracterizado na troca de íons (força próton motora), e outra pelo uso energético de ATPs (HASSANZADEH et al, 2020).

Portanto, a classificação das bombas de efluxo ocorre de acordo com sua fonte energética, sua estrutura característica e mecanismo de ação, classificando-as da seguinte maneira: Superfamília grande facilitadora (Major facilitator superfamily - MFS); Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (Small multidrug resistance family - SMR); Superfamília de divisão celular de nodulação de resistência (Resistance-nodulation-cell division superfamily - RND); Superfamília de extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos (Multidrug and toxic compound extrusion family - MATE) e Superfamília ligada à ATP cassete (ATP- binding cassette superfamily - ABC) sendo as quatro primeiras usuárias do sistema de força próton-motora e apenas a última dependente do uso energético de ATPs (PIDDOCK et al., 2006; COSTA et al., 2014; HASSANZADEH et al, 2020 ; SINHA et al., 2024).

No total, mais de 15 bombas de efluxo de diferentes famílias já foram descritas para *S.aureus* (HASSANZADEH et al, 2020). Dentro da família MFS estão presentes a norA, norB, norC, MdeA, SdrM, LmrS, QacA, and QacB, sendo norA a mais predominante e mais estudada bomba de efluxo principalmente por ser super expressa em cepas MRSA (FETSCH, A. 2018). Essas proteínas são codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano e são semelhantes às bombas de efluxo de tetraciclina (tetA) de *Escherichia coli* e também às de *Bacillus subtilis* (Bmr). Por força próton-motora são capazes de exportar moléculas como fluorquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacino, norfloxacino) e corantes como brometo de etídeo

e rodamina (COSTA et al., 2013; SINHA et al., 2024). Ainda, dentro da família MSF, codificadas por plasmídeos, encontram-se as bombas QacA e QacB especializadas em exportar substâncias desinfetantes como clorexidine, amônia quaternária, cloreto de benzalcônio e corantes como DAPI, brometo de etídeo e rodamina (SINHA et al., 2024).

Conferindo resistência às tetraciclinas em *S. aureus* por mecanismos de efluxo existem as bombas também pertencentes a família MFS codificadas pelos genes tet(K) e tet(38) (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022). O primeiro gene, presente em um plasmídeo (pt181), é considerado a principal forma de resistência a tetraciclinas. Esse codifica proteínas capazes de exportar tetraciclinas, oxitetraciclinas, clortetraciclina e em menor grau minociclinas, doxiciclinas e deoxitetraciclinas protegendo o ribossomo celular da ação dessa classe de fármacos (FETSCH, A. 2018). Essas bombas ainda são capazes de trabalhar com estímulos externos como estresse por sódio, estresse por pH básico ou por deficiência de potássio. O gene tet(38), considerado um gene conservado entre MRSA e MSSA, encontra-se no cromossomo bacteriano e produz uma bomba de efluxo com 46% de semelhança a tet(k). Essa é capaz de exportar alguns ácidos graxos, tetraciclinas e auxilia o *S. aureus* a colonizar a pele de camundongos e também a sobreviver em abscessos (TRUONG-BOLDUC QC, et al., 2015; SINHA et al., 2024).

A Superfamília ligada à ATP cassete utiliza como fonte de energia a hidrólise de ATP para o transporte de aminoácidos, açúcares, íons, drogas, polissacarídeos e proteínas. Seus transportadores são estruturados em complexos multiproteicos, que formam um canal de transporte pela membrana citoplasmática, e por proteínas citoplasmáticas com atividade de ATPases (SINHA et al., 2024). Dentro dessa família são encontrados genes presentes no cromossomo como Sav1866 e AbcA responsáveis pelo transporte de substâncias como brometo de etídeo, rodamina, Hoechst 33342 e fármacos como oxacilina, imipenem, meticilina, cefotaxima, nafcilina e penicilina G. No DNA plasmidial podem estar presentes os genes msrA, VgaA, Vga(A) LC, VgaB relacionados a resistência a eritromicina, lincomicina, clindamicinas e estreptogramina. O gene MsrA presente no plasmídeo pUL5054 apresenta resistência de 14 a 15 membros de macrolídeos, como a eritromicina (TINTINO, S.R., 2018; SINHA et al., 2024).

Menos estudadas em *S. aureus*, as famílias SMR, MATE e RND apresentam bombas de efluxo com origem plasmidial e também cromossomal com ação de extrusão para desinfetantes, corantes (QacC,D,G,H,J) e quinolonas (MepA) (COSTA et al., 2013; SINHA et al., 2024).

Para a avaliação da atividade de bombas de efluxo ainda não foi desenvolvida uma metodologia específica. Métodos fluorimétricos, uso de compostos radiomarcados, avaliação da concentração inibitória mínima para antimicrobianos após o uso de algum inibidor de efluxo e o uso do brometo de etídeo para avaliação fenotípica são alguns métodos utilizados (HASSANZADEH et al., 2020). Ainda, apenas fenotipicamente, um ensaio com ágar Muller Hinton adicionado de brometo de etídeo vem sendo utilizado como um método rápido e barato para observação da ação do sistema de efluxo. Contudo, não é possível identificar a qual família pertence ou a qual droga esse mecanismo pode estar possibilitando a resistência (DA COSTA KREWER et al., 2014; BJORLAND et al., 2005).

3.7 Fatores de virulência e toxinas

Diversos mecanismos genéticos auxiliam a invasão, colonização e a permanência de *S. aureus* nos tecidos do hospedeiro, produção de toxinas, formação de biofilme, capacidade de evasão do sistema imune, entre outros fatores que permitem que esse microrganismo não seja eliminado (CAMPOS et al., 2022). Um dos principais e mais conhecidos fatores de virulência é a ação da enzima coagulase. Essa é capaz de converter fibrinogênio do plasma do hospedeiro em fibrina, formando um escudo de pequenos coágulos que protegem os microrganismos da ação do sistema imune (MCVEY et al., 2016).

A formação de coágulos é ativada por dois fatores de coagulação: a coagulase (CoA) e pela proteína de ligação ao fator de von Willebrand (vWbp) (FETSCH, A., 2018). Essa enzima não está presente em todas as espécies do gênero *Staphylococcus* spp., a observação de sua capacidade de coagular o plasma de coelhos em laboratórios clínicos a torna uma ferramenta para classificação dos grupos *Staphylococcus* coagulase Positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). (MCVEY et al., 2016). Sua presença também pode ser detectada por biologia molecular na amplificação do gene CoA, um gene polimórfico que pode apresentar diferentes tamanhos de fragmentos. Esse polimorfismo é devido a adaptações genéticas para o não reconhecimento do sistema imune (REINOSO et al., 2008; SAEI et al., 2009).

Também, *Staphylococcus aureus* são capazes de produzirem diferentes tipos de toxinas como as hemolisinas, as enterotoxinas, leucotoxinas, a toxina da síndrome do choque tóxico -1 (TSST-1) e toxinas esfoliativas. Essas são capazes de causarem diferentes problemas em humanos e animais como intoxicações gastrointestinais, lesões cutâneas, abscessos, choques tóxicos, entre outros (PÉREZ et al., 2020; ZHU et al., 2023). Essas toxinas são denominadas

exotoxinas e podem ser classificadas em três tipos: toxinas de superantígenos, toxinas de dano de membrana e toxinas esfoliativas (ZHU et al., 2023).

As toxinas de superantígenos incluem as enterotoxinas (SEs) e a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (ZHU et al., 2023). As enterotoxinas são responsáveis por ocasionarem distúrbios gastrointestinais com náuseas e vômitos principalmente em humanos e são codificadas pelos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e pelos genes *seg-sei*, *sej-seiq* e *seiu*, sendo alguns desses genes detectados em infecções intramamárias em ruminantes (PÉREZ et al., 2020). Toxinas que causam danos em membranas, podem ser divididas em hemolisinas e leucocidinas ou leucotoxinas. Essas produzem poros na membrana celular do hospedeiro ativando caspases levando a apoptose celular (FETSCH, A., 2018). As hemolisinas (α -hemolysin; β -hemolysin), codificadas pelos genes *hla* e *hlb*, são toxinas que lisam eritrócitos e causam danos em tecidos celulares, sendo um dos principais fatores de virulência ativos na patogênese de *S. aureus* (ZHU et al., 2023).

S. aureus são capazes de produzir diversas leucotoxinas que participam na colonização celular do hospedeiro causando danos a células leucocitárias como monócitos e polimorfonucleados (PÉREZ et al., 2020). Entre as leucotoxinas mais comumente produzidas podemos citar HlgAB, HlgCB, LukAB/HG, Panton-Valentine leucocidin (PVL) e LukED (FETSH et al., 2018). Particularmente, a toxina LuKMF tem sido mais observada em cepas de infecções intramamárias bovinas. Essa toxina é capaz de lisar neutrófilos de ruminantes, sendo um importante fator de virulência nas infecções intramamárias. Isolados que são capazes de sintetizá-la são considerados adaptados as infecções intramamárias em ruminantes (VRIELING et al., 2016).

3.8 Formação de biofilme por *S. aureus* e genes envolvidos

Diversas espécies como plantas, animais e seres humanos são colonizados por organismos capazes de formar biofilme. (FLEMMING et al., 2016; OTTO, M., 2018). O biofilme caracteriza-se pela agregação de células bacterianas capazes de produzirem uma matriz extrapolimérica orgânica que as recobrem e protegem em superfícies abióticas ou bióticas onde se aderem (FLEMMING et al., 2016). Esse também é considerado uma forma de resistência bacteriana a antimicrobianos devido a dificuldade do fármaco se difundir e atingir o microrganismo no tecido afetado, além de ser uma estrutura que permite uma melhor evasão do sistema imune do hospedeiro (OTTO, M., 2018; PEDERSON et al., 2020).

Sua matriz extrapolimérica é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas,

lipídeos e DNA extracelular (eDNA). Essa estrutura possibilita interações dinâmicas e complexas entre bactérias que se beneficiam estruturalmente e funcionalmente através de maior hidratação, melhor captação de recursos, capacidade digestiva e pela transferência horizontal de genes e proteção contra antimicrobianos (ARCIOLA et al., 2015; FLEMMING et al., 2016).

Bactérias em um biofilme demonstram características fenotípicas, relacionadas a metabolismo, transcrição gênica e produção de proteína, diferentes a daquelas em fase planctônicas (OTTO, M., 2018). Em humanos e em animais esses microrganismos podem estar associados a infecções persistentes, contaminação de implantes e dispositivos médicos intravasculares e protéticos que podem levar a quadros de endocardite e sepse (OTTO et al., 2018; CHEN et al., 2020).

Dentro desse contexto, já há conhecimento que os principais genes associados a formação do biofilme em *S. aureus* estão relacionados ao operon *ica* responsável pela produção do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) composto por β -(1-6)-*N*-acetyl glucosamine, também denominada PNAG (ARCIOLA et al., 2015). Esse operon é composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* e regulados pelo promotor *icaR*. Os genes *icaA* e *icaD* são responsáveis pela produção de *N*-acetyl glucosamine, enquanto o gene *icaC* é responsável pela produção de uma proteína de membrana responsável por exportar o PIA. Por último, o gene *icaB* é responsável por desacetilar essa proteína, como pode ser visualizado na figura 2 (LE, PARK & OTTO., 2016; OTTO, M., 2018).

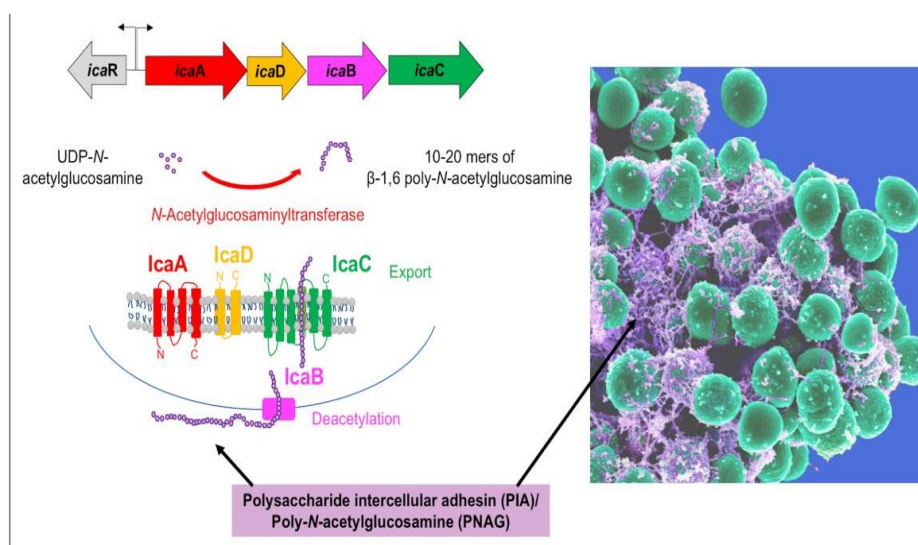


Figura 2. Exopolissacarídeo PIA/PNAG. Biossíntese de PIA pelo locus *icaADBC*. A direita, microscopia eletrônica de PIA (LE, PARK & OTTO., 2018).

O PIA/PNAG é relatado como o principal componente de formação em biofilmes por *S. aureus* por manter a coesão e aderência do biofilme. Contudo, estudos que realizaram a deleção do operon *ica* mostraram que apesar da deleção, a formação do biofilme ainda permanecia, demonstrando que a existência de outros mecanismos alternativos e independentes do PIA para a formação do biofilme (ARCIOLA et al., 2015). Outro gene associado a formação de biofilme é o gene *bap*, responsável pela transcrição da proteína associada ao biofilme (*bap*). Uma proteína de superfície de membrana com 2276 aminoácidos. Esse gene não está presente em todos os *S. aureus* sendo mais relacionado as cepas de origem animal, principalmente as de infecções intramamárias em bovinos (CUCARELLA et al., 2004; CAMPOS et al., 2020).

Para a análise de biofilmes podem ser utilizadas diferentes técnicas dependendo do objetivo pretendido, como quantificação da biomassa presente, viabilidade celular, análise da matriz extracelular, avaliação da expressão gênica, entre outros (AZEREDO et al., 2017). Por exemplo, o uso do meio de cultura Vermelho Congo demonstra de forma colorimétrica a formação de biofilme. Esse consiste em uma base nutritiva, adicionada de sacarose e do corante vermelho congo que é capaz de se ligar aos polissacarídeos da matriz extracelular e formar uma coloração enegrecida nas colônias demonstrando a formação de biofilme (Figura 1), (FREEMAN et al., 1989; ARCIOLA et al., 2015). Da mesma forma, inóculos cultivados em tubos, posteriormente enxaguados e corados com coloração cristal violeta também podem ser utilizados. Quantitativamente, STEPANOVIC (2000) utiliza a espectrofotometria no ensaio de adesão em placa para quantificar e classificar a biomassa total presente em inóculos cultivados após serem lavados e corados com coloração de cristal violeta (ARCIOLA et al., 2015; PEDERSEN et al., 2020).

Outras técnicas como microscopia eletrônica ou confocal podem ser boas opções para a visualização de estruturas tridimensionais, sua profundidade e avaliar, com o uso de fluoróforos, a viabilidade celular nos biofilmes. Análises moleculares permitem ainda analisar a expressão gênica de determinados genes envolvidos na formação de biofilmes, identificar agentes presentes em biofilmes mistos e avaliar a quantificação e viabilidade de células presentes (AZEREDO et al., 2017).

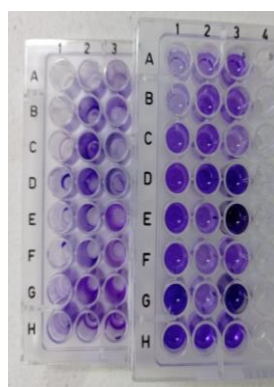


Figura 3. Ensaio de aderência de *Staphylococcus aureus* em microplaca. Fonte: Foto da autora (2023).

4. Referências.

- ACOSTA, A. C., SILVA, L. B. G. DA., MEDEIROS, E. S., PINHEIRO-JÚNIOR, J. W., & MOTA, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(7), 565–573. (2016). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>
- ADKINS, P. R., & MIDDLETON, J. R. Methods for diagnosing mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 34(3), 479-491, 2018.
- ALGHARIB, S. A., DAWOOD, A., & XIE, S. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Drug delivery**, 27(1), 292-308. 2020.
- ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., RAVAIOLI, S., & MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 5, 7. 2015.
- ASHRAF, A., IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Trop Anim Health Prod.** 50, 1193–1202, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A. R., & STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods. **Critical reviews in microbiology**, 43(3), 313-351. 2017.
- BALABAN, N.Q., HELAINE, S., LEWIS, K. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nat Rev Microbiol**, 17, 441–448, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- BARHEMA H.W., SCHUKKEN Y.H. & ZADOKS R.N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **J. Dairy Sci.** 89(6):1877-1895, 2006.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L. A. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.

BJORLAND, Jostein et al. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4363-4368, 2005.

BREED, R. S., AND J. D. BREW. The control of public milk supplies by the use of the microscopic method. **J. Dairy Sci.** 1:259–271. 1917.

CAMPOS, B., PICKERING, A.C., ROCHA, L.S. *et al.* Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. **BMC Vet Res** 18, 115, 2022.

CARVALHO, A. S. S., MENDES, B. F., FARIA, R. S. A., PERECMANIS, S., NOVAIS, E. D. P. F., RODRIGUES, M. M., & DE OLIVEIRA, C. N. M. Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, 7(9), 86772-86797, 2021.

CHAIN E, FLOREY HW, GARDNER AD et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **Lancet** 1940; 2:226-8

CHEN, L., TANG, Z. Y., CUI, S. Y., MA, Z. B., DENG, H., KONG, W. L., YANG, L. W., LIN, C., XIONG, W. G., & ZENG, Z. L. Biofilm Production Ability, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* from Various Veterinary Hospitals. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, 9(4), 264. 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040264>

CUCARELLA, C., TORMO, M.A., ÚBEDA, C., TROTONDA, M.P., MONZÓN, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. AND PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, 72, 2177–2185, 2004.

CHENG W, HAN S. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Anim Biosci.** 33(11):1699-1713, 2020.

DOI:<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>

CUNY, C.; WIELER, L.H.; WITTE, W. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans. **Antibiotics**, 4, 521-543, 2015. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040521>

DA COSTA KREWER, C., SANTOS AMANSO, E., VENERONI GOUVEIA, G., DE LIMA SOUZA, R., DA COSTA, M. M., & APARECIDO MOTA, R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 47(3), 511–518, 2014. doi:10.1007/s11250-014-0752-9

EMATER-DF. AgroEmater 2024. **Informação Técnica N° 01/2024**. EMATER-DF. Distrito Federal, 2024.

EMBRAPA GADO DE LEITE. ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2022.

FETSCH, A. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Staphylococcus Aureus**, 13–38, Elsevier. 2018. doi:10.1016/b978-0-12-809671-0.00002-4

FLEMMING, HC., WINGENDER, J., SZEWZYK, U. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol** 14, 563–575, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

FESSLER A., SCOTT C., KADLEC K., EHRLICH R., MONECKE S. & SCHWARZ S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **J. Antimicrob. Chemother.** 65(4):619-625. 2010. PMID:20164198. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq02>

FREITAS, F. A. Detecção de genes de virulência de *Staphylococcus aureus* identificados por PCR em amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – **FAO**. Gateway to dairy production and products. Disponível em: <https://www.fao.org/dairy->

production-products/production/en/. Acesso em 11 de março de 2025.

FREEMAN DJ, FALKINER FR, KEANE CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J Clin Pathol.** 42:872– 4, 1989.

GANDA, E. K., BISINOTTO, R. S., DECTER, D. H., & BICALHO, R. C. Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. **PloS one**,11(5), e0155314, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155314>

GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* AND *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science** v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005

HASSANZADEH, S., POURMAND, M. R., MASHHADI, R., & GHAZVINI, K. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial pathogenesis**, 139, 103850, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. de Produção de leite. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>. Acesso em 11 de março de 2025.

KATEETE, D.P., KIMANI, C.N., KATABAZI, F.A., OKENG, A., OKEE, M.S., NANTEZA, A., JOLOBA, M.L. AND NAJUJA, F.C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 9, 23, 2010.<https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>

KACZOREK-ŁUKOWSKA, E., MAŁACZEWSKA, J., SOWIŃSKA, P., SZYMAŃSKA, M., WÓJCIK, E. A., & SIWICKI, A. K. *Staphylococcus aureus* from Subclinical Cases of Mastitis in DairyCattle in Poland, What Are They Hiding? Antibiotic Resistance and Virulence Profile. **Pathogens** (Basel, Switzerland),11(12), 1404, 2022.

<https://doi.org/10.3390/pathogens11121404>

LAGO A., GODDEN S., BEY R., RUEGG P., LESLIE K. & DINGWELL R. Effect of using on-farm culture-based treatment system on antibiotic use a bacteriological cure for clinical mastitis. Proc. 47th Annual Meeting of the National Mastitis Council, New Orleans, LA, Jan 20-23, p.164-165. 2008.

LE, K. Y., PARK, M. D., & OTTO, M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *Frontiers in microbiology*, 9, 359, 2018.

LEÃO, J. M.; LIMA, J. A. M.; PÔSSAS, F. P.; PEREIRA, L. G. R. Uso da termografia infravermelha na pecuária de precisão. **Embrapa Gado de Corte**, p. 97–109, 2015.

LINDSAY, J. A., & HOLDEN, M. T. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in microbiology**, 12(8), 378–385, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.004>

LIM S.K, NAM H., JANG G., LEE H., JUNG S. & KIM T. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. **Foodborne Pathog. Dis.** 10(8):731-736. 2013. PMID:23746358. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>

MARCOS, J. Y., SORIANO, A. C., SALAZAR, M. S., MORAL, C. H., RAMOS, S. S., SMELTZER, M. S., & CARRASCO, G. N. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(3), 570-574, 1999.

MCVEY, D. S., KENNEDY, M., & CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia veterinaria**. Grupo Gen-Guanabara Koogan. 2016.

MIRZA, H . **Glycopeptide Resistance in S. aureus**. IntechOpen, 2017.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; KOWALEWSKI, C.; KROLAK-ULINSKA, A.; MARUSZA, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Mol. Sci.** 23, 8088. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>

MILLEZI, A. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, n.1, p.18-24, 2014. doi: 10.1590/S1516- 05722014000100003.

MÜLLER, T.; REMPEL, C. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil – parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, "Rio de Janeiro, Brasil", v. 9, n. 3, p. 122–129, 2021. DOI: 10.22239/2317-269X.01738.

NARANJO-LUCENA, A., & SLOWEY, R. Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 1-23. 2023.

NAUSHAD, S., NOBREGA, D. B., NAQVI, S. A., BARKEMA, H. W., & DE BUCK, J. Genomic analysis of bovine *Staphylococcus aureus* isolates from milk to elucidate diversity and determine the distributions of antimicrobial and virulence genes and their association with mastitis. *Msystems*, 5(4), 10-1128, 2020.

ORENSTEIN, ABIGAIL. “The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*.” 2006. Disponível em: <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf> acesso em: 30 de novembro de 2023.

OTTO M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiology spectrum*, 6(4), 2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>

PATERSON G.K., HARRISON E.M. & HOLMES M.A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22(1):42-47. 2014. PMID:24331435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>.

PEDERSEN, R. R., KRÖMKER, V., BJARNSHOLT, T., DAHL-PEDERSEN, K., BUHL, R., & JØRGENSEN, E. Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in veterinary science*, 8, 656810, 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>

PÉREZ, V. K. C., COSTA, G. M. D., GUIMARÃES, A. S., HEINEMANN, M. B., LAGE,

A. P., & DORNELES, E. M. S. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of global antimicrobial resistance**, 22, 792– 802, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>

PIDDOCK, LAURA JV. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629-636, 2006.

POZZO, M. D. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciênc. Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011. doi: 10.1590/ S0103-84782011005000029.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária Essencial**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

REINOSO, E. B., EL-SAYED, A., LÄMMLER, C., BOGNI, C., & ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological research**, 163(3), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.013>. 2008.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of dairyscience**, 100(12), 10381-10397, 2017.

RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 34(3), 413-425, 2018.

SCHALM, O. W., & NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 130(5), 199– 204, 1957.

SANTOS, MARCOS VEIGA DOS E FONSECA, LUIS FERNANDO LARANJA DA. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções**. São Paulo: Edição dos autores. 2019.

SEAGRI. Secretaria da Agricultura, Abastecimento e Desenvolvimento Rural. Sistema de informação. 2023.

SILVA, J.G., ALCANTARA A.M & MOTA R.A. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin – resistant: literature review. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(2): 223-228, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4996>

SILVA, V.; ARAÚJO, S.; MONTEIRO, A.; EIRA, J.; PEREIRA, J.E.; MALTEZ, L.; IGREJAS, G.; LEMSADDEK, T.S.; POETA, P. *Staphylococcus aureus* and MRSA in Livestock: Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages. **Microorganisms** 2023, 11, 124.

SONG, M., TANG, Q., DING, Y. *ET AL.* *Staphylococcus aureus* and biofilms: transmission, threats, and promising strategies in animal husbandry. **J Animal Sci Biotechnol** 15, 44, 2024. <https://doi.org/10.1186/s40104-024-01007-6>

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B. AND VLAHOVIC, M.S. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcus* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 40, 175–179, 2000.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. Role of the Tet38 efflux pump in *Staphylococcus aureus* internalization and survival in epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 83, n. 11, p. 4362-4372, 2015.

TINTINO, S. R. Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

VIEIRA, T. B., ALMEIDA, R., JESUS, I. B., FREITAS, F., KEMPER, R. T., RIZEK, C. F., & CASTRO, B. G. (2021). Microbiological and molecular aspects of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in West-Central Brazil. **Scientific Electronic Archives**, 14(1), 87–93. <https://doi.org/10.36560/14120211273>

VRIELING, Manouk et al. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *Staphylococcus aureus* and is produced in vivo during bovine mastitis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 37759,

2016.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L.J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.

WELLENBERG, G. J., VAN DER POEL, W. H., & VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary microbiology**, 88(1), 27–45, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00098-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00098-6)

WHO. World Health Organization Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics; WHO: Geneva, Switzerland, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> . Acesso em: 26 de fevereiro de 2025.

ZUO, Jiakun et al. Difference Analysis on Virulence Genes, Biofilms and Antimicrobial Susceptibility of Escherichia coli from Clinical and Subclinical Bovine Mastitis. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, p. 132, 2025.

ZHU, Zhihao et al. Molecular characteristics and pathogenicity of Staphylococcus aureus exotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 395, 2023.

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A. et al. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. *J.Dairy Sci.*, v. 72, p. 333337, 2005.

1 CAPÍTULO II.

ARTIGO 1.

Biofilmes bacterianos e suas implicações na mastite bovina.

Resumo: A mastite bovina é uma enfermidade que ocasiona prejuízos ao bem-estar animal, redução na quantidade e qualidade do leite produzidos. Em alguns casos como nas mastites causadas pelo agente *Staphylococcus aureus* essas podem se tornar crônicas e de difícil eliminação. Essa bactéria possui características intrínsecas que as fazem ser multirresistente a antimicrobianos, capaz de evadir do sistema imune e também de produzir biofilme no interior da glândula mamária. O presente trabalho tem como objetivos revisar o papel da formação de biofilmes dentro do contexto da mastite bovina abordando suas características, etapas de formação, principais agentes formadores e genes relacionados. Além de analisar as possíveis abordagens para o tratamento de infecções intramamárias, o controle e prevenção do desenvolvimento de biofilmes em utensílios e instalações industriais avaliando as implicações para a saúde pública e saúde animal.

Introdução

A mastite bovina caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária com aumento de volume, alterações na quantidade e qualidade do leite, aumento de sensibilidade, entre outros sinais clínicos que podem variar de acordo com a intensidade da inflamação e dano causado ao tecido mamário (RUEGG et al., 2017). Essa afecção pode ser classificada como mastite clínica quando é possível perceber sinais clínicos evidentes como dor, aumento de volume e temperatura, alterações no leite como pus, grumos ou sangue e é classificada em subclínica quando não há a apresentação de sinais clínicos, mas ocorrem alterações microscópicas que impactam na qualidade e quantidade do leite (ZUO et al., 2024).

A maior parte dos casos de mastites bovina é causada por bactérias de diferentes espécies. Algumas provocam reações inflamatórias agudas graves e estão associadas principalmente ao ambiente em que o animal se encontra. Outras, de caráter contagioso, são transmitidas de animal para animal por meio de utensílios mal higienizados, mãos de ordenhadores, ou até por vetores mecânicos como moscas e causam sinais clínicos pouco evidentes, mas com perdas e alterações silenciosas (CAMPOS et al., 2022).

Essas perdas apesar de não ocasionarem sinais evidentes alteram padrões físico-químicos como a Contagem de Células Somáticas (CCS) e padrões microbiológicos que comprometem e reduzem a qualidade do leite produzido (CHENG & HAN., 2020). Também podem repercutir de diversas formas: reduzindo o bem-estar animal, aumentando os custos na

produção do leite e intensificando o uso de antimicrobianos. O que torna essa uma afecção desafiadora para a indústria leiteira de forma global (TEH et al., 2015; PEDERSON et al., 2021).

A adaptação desses patógenos inclui mecanismos de evasão do sistema imune e resistência a antimicrobianos que tornaram essas infecções mais recorrentes, agressivas e de difícil eliminação (MELCHIOR et al., 2006; MELCHIOR et al., 2011). Dentro desses mecanismos podemos citar o desenvolvimento de fatores de virulência que auxiliam no escape do sistema imune com a ação de enzimas e toxinas, a resistência aos antimicrobianos e desinfetantes por meio de mutações, transferência de elementos genéticos móveis, alterações em sítios de ligação, inativação enzimática e presença de bombas de efluxo (PÉREZ et al., 2020; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Outro importante fator de virulência é a capacidade de formação de biofilme, um mecanismo de proteção utilizado por bactérias em ambientes hostis e situações estressantes que também auxilia na sobrevivência, colonização e dispersão dessas comunidades e pode ser um recurso valioso para a persistência de bactérias patogênicas durante a infecção (JAQUES & MOLOUIN, 2020). O biofilme caracteriza-se pela agregação em camadas de células bacterianas, por uma ou múltiplas espécies, capazes de produzirem uma matriz orgânica de substâncias poliméricas extracelular (EPS) tridimensional e hidrofóbica que as recobrem e protegem em superfícies abióticas ou bióticas onde se aderem fortemente (COSTERTON et al., 1999; FLEMMING et al., 2016).

A matriz EPS do biofilme é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular (eDNA). Essa estrutura possibilita interações dinâmicas e complexas entre bactérias que se beneficiam estruturalmente e funcionalmente com maior captação hídrica e de recursos, capacidade digestiva, transferência horizontal de genes e proteção contra a ação de antimicrobianos e sanitizantes (ARCIOLA et al., 2015; FLEMMING et al., 2016).

Essas interações recebem o nome de *Quorum sensing* e acontecem por sinalizações químicas de acordo com as necessidades ou densidade da comunidade bacteriana que se encontra em um biofilme. Dessa maneira, as bactérias em um biofilme demonstram características fenotípicas, relacionadas a metabolismo, transcrição gênica e produção de proteína, diferentes daquelas em fase planctônicas (MAH & O'TOOLE., 2001; OTTO, M., 2018).

Biofilmes também conferem resistência bacteriana a antimicrobianos devido a dificuldade do fármaco em se difundir pela EPS e atingir o microrganismo no tecido afetado (SONG et al., 2024). Do mesmo modo, podem ocorrer interações entre a matriz e o antimicrobiano, inativando ou diminuindo sua biodisponibilidade até o alcance do alvo ou ainda

a presença de bactérias metabolicamente menos ativas no biofilme que não são afetadas pelo medicamento. Sua característica dimensional também impede a ação de fagócitos pelo não reconhecimento de antígenos bacterianos (MAH & O'TOOLE., 2001; OTTO, M., 2018).

Considerando os avanços recentes na compreensão da regulação gênica envolvida na formação de biofilmes e na identificação de novos fatores de virulência e resistência, este trabalho tem como objetivo revisar criticamente os mecanismos moleculares associados à patogênese bacteriana na mastite bovina e discutir estratégias promissoras para prevenção e controle dentro de fazendas e na indústria leiteira, com foco na inovação terapêutica e sanitária.

Material e métodos

Para o alcance dos objetivos desse estudo, foi realizado o método da revisão integrativa incluindo estudos que abordassem biofilme na mastite bovina, biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e biofilmes formados na indústria leiteira. Foram pesquisados e avaliados os seguintes tópicos: mecanismos de formação de biofilme, propriedades moleculares, metodologias de estudos com biofilmes, biofilmes associados a resistência antimicrobiana, biofilmes na indústria leiteira, alternativas de tratamentos e prevenção. Foram incluídas pesquisas, trabalhos e revisões publicados entre o ano 2000 e 2025, no idioma inglês. A pesquisa bibliográfica foi realizada no banco de dados das plataformas Pubmed e Google Acadêmico, com buscadores “biofilm, mastitis, *Staphylococcus aureus*” ou “biofilm, dairy industry, *Staphylococcus aureus*”.

Resultados e discussão

Patógenos formadores de biofilme na mastite bovina.

Diversos microrganismos podem estar envolvidos na patogênese da mastite bovina, entre eles bactérias, fungos, vírus e algas (WELLENGERG et al., 2002; FIDELIS et al., 2024; NARANJO-LUCENA & SLOWEY., 2024). Bactérias são os agentes mais predominantes e mais estudados *in vitro* na capacidade de formação de biofilmes relacionados a mastite. Extensamente pesquisado por seus fatores de virulência e resistência antimicrobiana, o *Staphylococcus aureus* é também o agente mais amplamente caracterizado na capacidade de formação de biofilme (MELCHIOR, M.B., 2011; PEDERSON et al., 2020). Entre outros agentes envolvidos estão, o *Staphylococcus coagulase negativo*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Prototecha* spp. (Melchior, M.B., 2011; DA COSTA KREWER et al., 2014; SILVA et al., 2014; FRANCISCO

et al., 2021; FIDELIS et al., 2023; FIDELIS et al., 2024). Devido a maior prevalência e também maior número de estudos relacionados ao *Staphylococcus aureus* com capacidade de formação de biofilme na mastite, focaremos o escopo da revisão nesse microrganismo (FETSCH, A. 2018).

Muitos estudos demonstram a habilidade intrínseca da bactéria *Staphylococcus aureus* em formar biofilmes em diferentes superfícies e suas implicações na saúde humana e animal (SONG et al., 2024). A presença em dispositivos médicos (lentes de contato, próteses, cateteres, tubos endotraqueais, marca-passos, instrumentos cirúrgicos) e também em ambientes hospitalares e veterinários já tem sido bem documentada com implicações como endocardites, infecções prostéticas e sepse (OTTO et al., 2018; CHEN et al., 2020). Dentro da indústria alimentícia há relatos também de biofilmes formados em encanamentos, tanques e equipamentos de ordenha que servem como fonte de novas contaminações para os animais e impactam no produto final (MEDINA et al., 2025).

Fases na formação do biofilme: aderência inicial

O desenvolvimento de um biofilme ao ser observado *in vitro* apresenta três ou cinco estágios distintos (de acordo com o autor): aderência, proliferação/maturação e dispersão (Figura 1) (OTTO et al., 2018) ou aderência primária, adesão irreversível, desenvolvimento precoce da arquitetura, maturação e dispersão (SREY et al., 2013). A aderência inicial de células bacterianas de *Staphylococcus* spp. em superfícies ou em um tecido, ocorre em contraste com organismos móveis, como um processo passivo e dependente de interações físico-químicas com a superfície (MELCHIOR et al., 2006).

O gênero *Staphylococcus* possui diversas proteínas de adesão, adesinas, que atuam nessa fase inicial. Diversas proteínas são expressas na superfície de *S. aureus*, denominadas MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Tais componentes se ligam às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (MELCHIOR, M.B, 2011; CAMPOS et al., 2020). Geneticamente, o *S. aureus* apresenta 20 dessas proteínas, como a proteína de ligação à elastina (ebpS), proteína de ligação à laminina (eno), proteína de ligação ao colágeno (cna), proteínas de ligação à fibronectina A e B (finbA, finbB), proteína de ligação ao fibrinogênio (fib) e fatores de aglutinação A e B (clfA, clfB), que promovem a adesão bacteriana as células do hospedeiro ou de superfícies (MELCHIOR et al., 2006; ATSHAN et al., 2012).

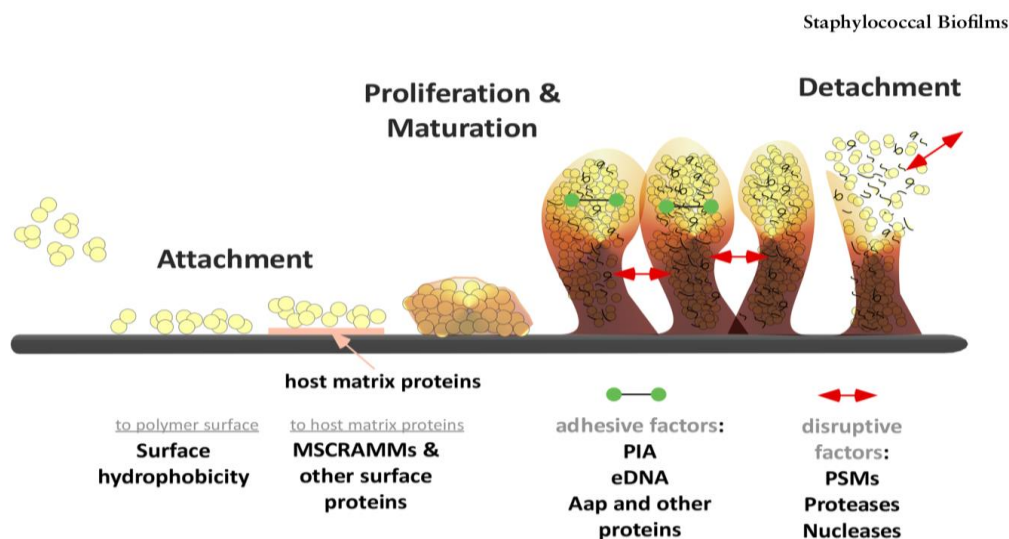


Figura 1. Desenvolvimento do biofilme bacteriano. Adaptação de OTTO et al., 2018.

Produção da matriz extracelular

O segundo estágio é caracterizado pela multiplicação bacteriana e a formação de uma estrutura madura consistindo de diversas camadas recobertas e conectadas entre si pela matriz extracelular (MELCHIOR et al., 2006). Nessa fase, forma-se a matriz que é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácidos teicóicos e DNA extracelular (eDNA). Essa matriz tem como importância a conservação da estruturação e integridade do biofilme assim como proteção contra dissecação, falta de nutrientes e agressões físicas, químicas e biológicas do ambiente (FETSH, A., 2018).

Ainda, acredita-se que compostos de bactérias que sofreram lise celular, como seu DNA livre, são aproveitados na síntese da EPS e também na sua manutenção e dispersão de genes de resistência a antimicrobianos (SONG et al., 2024). Também nesse momento, um polissacarídeo denominado polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) começa a ser produzido com o objetivo de manter a proximidade e o contato célula a célula (ARCIOLA et al, 2015). Esse contato permite melhor comunicação por sinalização química entre os indivíduos dessa comunidade e permite que o biofilme se torne uma estrutura dinâmica entre os microrganismos (OTTO, M., 2018; FETSH, A 2018).

O PIA é composto por β -(1-6) -N-acetyl glucosamine, também denominada PNAG. Dentro desse contexto, já se tem conhecimento que os principais genes associados a formação do PIA por *Staphylococcus* spp. estão relacionados ao operon cromossomal *ica*. Esse operon é composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* e regulados pelo promotor *icaR*. Os genes *icaA* e

icaD são responsáveis pela produção de N-acetyl glucosamine, enquanto o gene *icaC* é responsável pela produção de uma proteína de membrana responsável por exportar o PIA. Por último, o gene *icaB* é responsável por desacetilar essa proteína (ARCIOLA et al., 2015; OTTO, M., 2018).

O PIA/PNAG é relatado como o principal componente de formação em biofilmes por *S. aureus* e essencial na coesão do biofilme. Entretanto, estudos que realizaram a deleção do operon *ica* mostraram que apesar da deleção, a formação do biofilme ainda permanecia, demonstrando a existência de outros mecanismos alternativos e independentes de PIA para a formação do biofilme, não o considerando um componente chave (CUCARELLA et al., 2004; ARCIOLA et al., 2015). Outro gene associado a formação de biofilme é o gene *bap*, responsável pela transcrição da proteína associada ao biofilme (*bap*). Uma proteína de superfície de membrana com 2276 aminoácidos responsável por realizar uma fixação primária a superfícies (CUCARELLA et al., 2004; CAMPOS et al., 2020). Esse gene não é encontrado em todos os *S. aureus*, estando inserido em uma ilha de patogenicidade (SaPIbov2) localizada em um transposon. Consequentemente, devido às suas especificidades com o hospedeiro, esse fato torna sua transferência horizontal com outras cepas mais difícil, tornando esse gene mais relacionado as cepas de origem animal, principalmente as relacionadas com infecções intramamárias em bovinos (VAUTOR & THIERY, 2008).

Desprendimento e Dispersão

A disponibilidade de nutrientes, forças mecânicas ou *Quorum sensing* influenciam o momento em que biofilmes maduros iniciam o desprendimento de células bacterianas das camadas mais superficiais do biofilme. Outros fatores como pH interno, perfusão de oxigênio, fontes de carbono e osmolaridade também limitam o crescimento do biofilme e estimulam seu desprendimento (MELCHIOR et al., 2006).

Enzimas como nucleases, proteases e moléculas semelhantes a surfactantes, como as modulinas solúveis em fenol (PSMs) estafilocócicas, interrompem interações não covalentes, degradam a matriz extracelular e desprendem porções ou células planctônicas no ambiente ou tecido permitindo novas colonizações (OTTO, M., 2018; FETSH, A., 2018).

Essa etapa é essencial para novas contaminações onde posteriormente inicia-se a formação de um novo biofilme em um novo local, indivíduo ou superfície garantindo sua sobrevivência e perpetuação (SONG et al., 2024).

Aderência, Invasão e formação de Biofilme na glândula mamária

Durante os anos 90, muito se questionou em como se desenvolve a formação do biofilme, estrutura que nesse período era denominada de “slime” (BASELGA et al., 1994). A partir desse momento, com os trabalhos de BALSEGA et al., iniciaram-se os primeiros estudos sobre biofilmes dentro da glândula mamária e suas implicações no tratamento da mastite bovina (MELCHIOR, M.B., 2011).

Muitos fatores de riscos estão relacionados a ocorrência de mastite, como os fatores relacionados ao ambiente (cama, alimentação, sistema de ordenha), ao indivíduo (imunidade, genética, idade, estágio de lactação, número de lactações) e ao microrganismo isolado (RUEGG et al., 2017). Quando uma bactéria consegue vencer e ultrapassar as barreiras inatas de proteção do canal do teto e do sistema imune inicia-se então o processo de colonização no interior da glândula mamária (CHENG & HAN., 2020).

A bactéria *S. aureus* inicialmente realiza sua adesão ao epitélio da glândula mamária com o uso de proteínas especializadas em adesão pertencentes a família MSCRAMMs. Em seguida, esse patógeno pode realizar a invasão intracelular pela ligação da proteína ClfA (clumping factor A) com o receptor annexin A2 ou também com a ação da Fibronectin-binding protein (FnbP-A, FnbP-B) com os receptores $\alpha 5 \beta 1$ presentes na superfície celular (GARZONI & KELLEY, 2009; CASTILHO et al., 2017). Diversos estudos com deleção gênica ou produção de proteínas truncadas já demonstraram a importância de algumas MSCRAMMs para a adesão e invasão celular, como as Clumping factor (A e B) e as Fibronectin-binding protein (FnbP-A, FnbP-B) que se aderem e formam uma ligação com o receptor celular do hospedeiro desorganizando seu citoesqueleto e permitindo a invasão bacteriana (MELCHIOR, M.B, 2011; CAMPOS et al., 2020). A invasão celular também é um potencial fator de virulência que permite que o microrganismo sobreviva e se multiplique, não sofra com as ações de defesa do hospedeiro ou de antimicrobianos e persista no hospedeiro sem causar sinais clínicos aparentes (CASTILHO et al., 2017).

Uma alternativa para a bactéria é iniciar a formação de biofilme no epitélio da glândula mamária com a formação da matriz extracelular, produção de PIA ou da proteína associada ao biofilme (*bap*) (MELCHIOR et al., 2006). Poucos estudos foram capazes de comprovar a produção de biofilme *in vivo* em infecções intramamárias (CAMPOS et al., 2020; PEDERSEN et al., 2020). Entretanto, alguns trabalhos demonstram a presença com

imunomarcações. Como o estudo realizado por SCHÖNBORN & KRÖMKER (2016) que utilizaram a técnica de imunofluorescência e detectaram a presença do polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) em swabs e fragmentos de glândulas mamárias coletadas de vacas abatidas por apresentarem mastite crônica causada por *S.aureus*.

Com o amadurecimento do biofilme, ocorre a liberação de células planctônicas que podem desencadear o reconhecimento pelo sistema imune e gerar sinais clínicos (Melchior, M.B, 2011). Essas células reiniciam a infecção podendo migrar para áreas mais profundas da glândula e permanecerem na forma intracelular ou de biofilme (Figura 2) (MELCHIOR, M.B, 2011; CASTILHO et al., 2017). Já se é conhecido que nem todas as estirpes de *S.aureus* são capazes de realizarem a invasão celular (HENSEN et al., 2000). Da mesma forma que nem todas as estirpes são formadoras de biofilme ou capazes de formar biofilme na mesma intensidade (CASTILHO et al., 2017). Existem estudos que demonstram a capacidade de persistência intracelular após a invasão celular na forma de agregados bacterianos, vacuolizados ou não. Contudo, são poucos trabalhos publicados e o assunto carece de mais estudos (GARZONI & KELLEY., 2009; MELCHIOR, M.B, 2011).

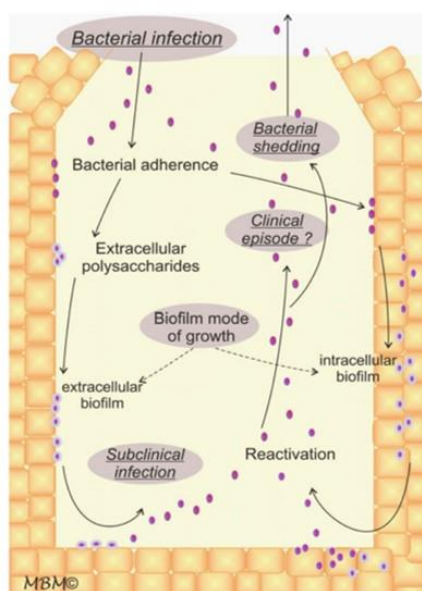


Figura 2. Esquema representativo de infecção no úbere bovino por *Staphylococcus aureus*. Imagem retirada de MELCHIOR, M. B, (2011).

Biofilmes e a resistência antimicrobiana

O tratamento para a mastite bovina se apoia em ações de higiene e descontaminação

do ambiente, manejo dos animais doentes e saudáveis e principalmente na terapia com antimicrobianos, o que torna a bovinocultura leiteira uma das produções com maior uso de antimicrobianos (RUEGG et al., 2017). Esse uso exacerbado e em muitos momentos sem alternativas viáveis oferece riscos para a saúde animal e também na saúde pública com o risco de aumento de resistência antimicrobiana e o surgimento de cepas multirresistentes como o *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA). Além da obrigatoriedade do descarte do leite devido a resíduos de medicamentos (CHENG & HAN., 2020; NARANJO-LUCENA & SLOWEY., 2024).

Para o tratamento e controle da mastite, diversas classes de antimicrobianos são frequentemente utilizadas. Entre elas os beta-lactâmicos, tetraciclínas, macrolídeos, aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluorquinolonas por via sistêmica ou intramamária, sozinhos ou em combinações (CHENG & HAN., 2020; NARANJO-LUCENA & SLOWEY., 2024). Contudo, as taxas de cura microbiológica com desaparecimentos de sinais clínicos para *Staphylococcus aureus* são muito baixas, variando entre 3% a 13% dependendo de idade, estágio da lactação e número de CCS (BARKEMA et al., 2006). Algumas características do agente patogênico como capacidade de formação de biofilme, resistência aos antimicrobianos e invasão intracelular influenciam junto com outros fatores na dificuldade do tratamento e cronicidade e persistência da doença (NARANJO-LUCENA & SLOWEY., 2024).

A formação de biofilmes permite às bactérias diversos benefícios de proteção e vantagem para sua sobrevivência (SONG et al., 2024). A matriz extracelular formada no biofilme possibilita que bactérias ali presentes permaneçam protegidas de adversidades externas como mudanças de pH, salinidade, presença de metais pesados, defesas do hospedeiro e a ação de medicamentos como antimicrobianos (FETSH, A., 2018). Estima-se que os biofilmes proporcionem uma tolerância 10 a 1.000 vezes maior aos efeitos dos antibióticos (MAH & O'TOOLE., 2001). Essa matriz impede a difusão do medicamento ou desinfetantes, permitindo que camadas medianas e profundas não recebam o fármaco ou que o medicamento não alcance seu alvo celular (OTTO et al., 2018). Também, a ação do sistema imune sob a matriz torna-se reduzida devido a incapacidade de fagócitos atingirem todas as células. Ainda, dentro da matriz pode ocorrer transferência de elementos genéticos móveis como a troca de diversos genes de resistência ou fatores de virulência, podendo ocorrer tanto por transformação ao incorporarem genes livres na matriz como por conjugação entre bactérias próximas (MELCHIOR et al., 2006; FETSH, A., 2018; OTTO et al., 2018).

Biofilmes já aderidos e maduros apresentam em suas camadas distintas subpopulações

que estão em diferentes fases de crescimento e atividade metabólica, como por exemplo, bactérias próximas da superfície em maior contato com oxigênio e nutrientes apresentam maior divisão celular e metabolismo mais ativo (Melchior et al., 2006). Enquanto camadas medianas e profundas podem ter indivíduos metabolicamente menos ativos ou em completa dormência devido a menor disponibilidade de nutrientes e oxigênio. As que apresentam metabolismo reduzido e pouca ou nula divisão celular, recebem o nome de persistentes. Esse estado metabólico impede ação de alguns antimicrobianos que atuam em fases de multiplicação bacteriana como os beta-lactâmicos (MELCHIOR et al., 2006; FETSH, A., 2018; OTTO et al., 2018).

Outro mecanismo utilizado por bactérias em fases planctônicas e em formas sésseis, são proteínas de membranas conhecidas como bombas de efluxo que auxiliam as células a retirarem do seu interior substâncias potencialmente tóxicas (SINHA et al., 2024). Contudo, alguns estudos já demonstraram que as expressões de genes relacionados às bombas de efluxo aumentam durante a formação do biofilme comparadas a fases estacionárias (BEEKEN et al., 2004; ALAV et al., 2018; SINHA et al., 2024). ALAV et al. (2018) cita quatro diferentes funções das bombas de efluxo dentro de um biofilme: retirada de compostos tóxicos como medicamentos e desinfetantes; transporte de moléculas sinalizadoras do *Quorum sensing* e também da matriz EPS para o exterior da célula; efluxo de moléculas indutoras e promoção ou inibição da agregação celular. Além disso, em *S.aureus*, pesquisas já demonstraram o aumento da expressão dos genes *mdeA*, *nor(B)*, *nor(C)* durante o crescimento de biofilmes (SINHA et al., 2024). Esses genes estão relacionados ao efluxo de compostos de amônia quaternária e antibióticos (*mdeA*), também de cetrimida, quinolonas e tetraphenylphosphonium e brometo de etídio (*nor(B)*, *nor(C)*), demonstrando dessa maneira que as bombas de efluxo possuem um importante papel na manutenção do biofilme e também na resistência antimicrobiana (ALAV et al., 2018; SINHA et al., 2024).

Impacto de biofilmes na bovinocultura leiteira

Avaliando o impacto dos biofilmes sob uma ótica mais macroscópica e aplicada a realidade das fazendas produtoras de leite e da indústria leiteira, a formação de biofilmes também é um desafio constante no dia a dia (TEH et al., 2015). Isso é devido, principalmente, pela dificuldade de retirada desses agregados das superfícies, eliminação de microrganismos potencialmente patogênicos, escolha correta de métodos e produtos para desinfecção, além do desafio de não causar uma contaminação química nos alimentos produzidos por extrapolar os

limites permitidos de uso (TEH et al., 2015; OLAIMAT et al., 2024).

O *S.aureus*, assim como outros microrganismos, ao passarem por estresse podem aderir e produzir biofilmes em diferentes superfícies como tubulações, tanques, teteiras, mangueiras e borrachas (MEDINA et al., 2025). Essa formação ocorre principalmente por falhas nos protocolos de limpeza e higienização dos equipamentos. Erros de higienização como temperatura inadequada da água, escolha dos agentes sanitizantes, diluições incorretas das soluções de limpeza ou intensidade irregular do fluxo de água podem levar a resíduos de leite, proteínas, gorduras, carboidratos e minerais em superfícies criando ambientes adequados para o desenvolvimento de biofilmes (TEH et al., 2015; LATORRE et al., 2022).

Contudo, outros fatores podem influenciar a formação de biofilme, como habilidades intrínsecas do microrganismo, tipo do material da superfície, sua rugosidade ou presença de fissuras, rachaduras, arranhões e condições operacionais (como tempo, frequência de utilização, diluições realizadas) (MEDINA et al., 2025). Com o fluxo de leite durante a ordenha, fragmentos de biofilme podem se desprender e se deslocarem por esses equipamentos. Com isso, há o risco de potenciais novas infecções intramamárias, contaminação dos tanques, consequentemente alterações microbiológicas do leite e derivados produzidos e uma possível fonte de bactérias persistentes em utensílios e na aparelhagem (LEE et al., 2014; MEDINA et al., 2025).

Os principais materiais utilizados nos equipamentos industriais e nas fazendas leiteiras consistem em aço inoxidável, borracha Buna-n e silicone (SREY et al., 2013; LEE et al., 2014). LEE et al. (2014) avaliou a formação de biofilmes em diferentes materiais de superfícies comumente utilizadas em salas de ordenha no Estado de São Paulo, Brasil. Trinta e um diferentes pulsotipos de *S.aureus* foram capazes de formar biofilme no ensaio de aderência em microplaca. Desses 41,9% formaram biofilme em aço inoxidável e 38,7% em borrachas e nenhuma formação em silicone. MEDINA et al. (2025) em estudo semelhante com microscopia eletrônica utilizando coupons de diferentes materiais (aço inoxidável, borracha buna-n, borracha monômero de etileno-propileno-dieno -EPDM, borracha de silicone, vidro borossilicato, cloreto de polivinila – pvc) observou que apenas a borracha Buna-n teve diferença estatística significativa para a formação de biofilme em superfícies de equipamentos, recomendando a troca regular das borrachas em equipamentos de ordenha.

Ainda com consequências para a saúde animal, LATORRE et al. (2022) analisou, utilizando microscopia eletrônica e confocal, a formação de biofilmes em mangueiras utilizadas para desviar o leite impróprio para consumo como o leite de vacas com mastite clínica, sob

tratamento com antibióticos ou o leite de transição e colostro em equipamentos de ordenha. Como resultados obtidos verificou a presença de biofilmes mistos (bacilos gram negativos, cocos gram positivos e leveduras) de diferentes espessuras em todas as fazendas avaliadas. Concluindo que a limpeza e higienização dessas partes presentes em equipamentos de ordenha são comumente negligenciadas e podem oferecer riscos de contaminações no colostro e no leite destinado às bezerras (LATORRE et al., 2022).

Como visto, diversos são os fatores que influenciam a formação de biofilmes e também a correta limpeza e higienização dos equipamentos. O que torna o monitoramento regular dos procedimentos de limpeza de todas as estruturas presentes no ambiente de ordenha, armazenamento e beneficiamento do leite e o cumprimento adequado de todas as etapas essencial para um controle efetivo da formação de biofilmes nesses ambientes (LATORRE et al., 2022). A eficácia desses procedimentos deve ser monitorada na rotina básica de produção e medidas como busca por incrustações e realização de teste como contagem bacteriana podem ser realizados (TEH et al., 2015).

Métodos de detecção e diagnóstico de biofilmes

Devido a diversidade de possíveis locais para a formação de um biofilme (superfícies em equipamentos industriais, dispositivos médicos, ou em tecidos biológicos) e também os parâmetros que se deseja avaliar, ainda não há um teste “padrão ouro” (OLAIMAT et al., 2024). Por isso, diversas metodologias tradicionais podem ser utilizadas para a detecção da capacidade de formação de biofilmes por diferentes microrganismos com suas vantagens e desvantagens. Essas técnicas podem ser divididas de acordo com o objetivo pretendido como a quantificação de biomassa, viabilidade celular, composição da matriz extracelular ou apenas a observação qualitativa por métodos colorimétricos (AZEREDO et al., 2017). Em estudos relacionados a mastites, amostras de leite após cultivo e identificação microbiológica tem sido as mais frequentemente analisadas com o objetivo de se quantificar a biomassa formada em biofilmes *in vitro* (PEDERSEN et al., 2020).

Qualitativamente, podem ser citadas técnicas como o ensaio para a visualização de biofilmes em tubos de ensaio, técnica em que se observa a formação de biofilme em tubos após enxague e coloração com cristal violeta ou safranina e outros corantes (PEDERSEN et al., 2020). Esse método depende do julgamento do observador o que o torna pouco confiável e variável.

Também, qualitativamente de forma colorimétrica, pode-se utilizar para a observação

da produção de biofilme por microrganismos gram-positivos o cultivo em Ágar Vermelho Congo. Esse foi um meio criado por FREEMAN et al. (1989) para a observação de *Staphylococcus* Coagulase negativo e adaptado posteriormente a outros microrganismos. Esse meio consiste em uma base nutritiva adicionado de açúcar e do corante vermelho congo capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular e apresentar diferentes colorações de acordo com a produção de biofilme. Com coloração preta para fortes formadores e rosa ou vermelho para não formadores ou fracos formadores (FREEMAN et al., 1989; ARCIOLA et al., 2002; PEDERSEN et al., 2020).

Para a quantificação da biomassa bacteriana capaz de se aderir a uma superfície *in vitro*, a técnica mais utilizada em estudos de diferentes microrganismos é o ensaio de aderência em microplaca (EAM) também conhecida como cristal violeta (AZEREDO et al., 2017; OLAIMAT et al., 2024). Essa técnica baseia-se no cultivo bacteriano em placas de poliestireno com posterior enxague e secagem em diferentes tempos, coloração com cristal violeta, ressuspensão e quantificação da luz absorvida pela biomassa aderida em cada poço por espectrofotometria (AZEREDO et al., 2017; PEDERSEN et al., 2020). Com esses valores é possível classificar de acordo com STEPANOVIC et al. (2000) as amostras em não formadoras, fracas, moderadas ou fortes formadoras de biofilme. Essa análise tem sido a mais utilizada nos estudos relacionados a biofilmes formados em mastites bovinas e também em outras afecções devido ao seu baixo custo para a realização e fácil operação, tendo como desvantagem a impossibilidade de saber se as células estão viáveis ou não dentro do biofilme (AZEREDO et al., 2017; PEDERSEN et al., 2020; OLAIMAT et al., 2024).

Com o intuito de se monitorar a formação do biofilme em tempo real a técnica baseada no “Flow cell” pode ser utilizada. Essa possibilita avaliar a formação de biofilmes em um sistema aberto, onde é possível regular o fluxo de nutrientes, mimetizando a formação de biofilmes *in vivo* com possíveis estresses como a passagem contínua de líquidos ou fluídos ou também sob a ação de um determinado composto ou antimicrobiano. Posteriormente pode ser feita uma associação dessas células com fluoróforos (LIVE/DEAD) com subsequente microscopia confocal e avaliar a viabilidade celular e sua estrutura tridimensional (AZEREDO et al., 2017).

Outros métodos podem ser citados como a visualização por microscopia eletrônica ou microscopia confocal a laser que possibilitam analisar a estrutura espacial, forma 3D, sua profundidade e quantificar volume e outros parâmetros com diferentes fluorescências (AZEREDO et al., 2017; PEDERSEN et al., 2021). Além dessas, podem ser empregues as

técnicas de pesquisa molecular para a identificação dos agentes bacterianos envolvidos, investigação de genes específicos de formação de biofilme, expressão gênica e também quantificação e avaliação de viabilidade celular (AZEREDO et al., 2017).

Terapias alternativas para o controle de biofilmes

Em diferentes domínios como nas indústrias de processamento de alimentos, na medicina humana e veterinária, em indústrias farmacêuticas, na engenharia naval e em muitos outros locais, a formação de biofilmes em superfícies é um desafio e a busca por soluções, métodos preventivos ou de controle são essenciais e alvo de diversas pesquisas (TEH et al., 2015; CHEN et al., 2020; OLAIMAT et al., 2024).

No contexto da mastite bovina, tratamentos convencionais com antimicrobianos intra mamários e sistêmicos muitas vezes não apresentam o resultado esperado. Isso pode ser devido a resistência antimicrobiana, o número reduzido de novas opções de antimicrobianos e pela capacidade de formação de biofilmes de muitos microrganismos (NALE & MCEWAN, 2023). O que leva a infecções crônicas e persistentes. Dessa forma, há uma mudança nas perspectivas das pesquisas com o objetivo de se obter soluções inovadoras para a eliminação, desestabilização ou controle de biofilmes nas infecções intramamárias. Podem ser citadas pesquisas emergentes com uso de nanopartículas, utilização de bacteriófagos, busca por novos compostos químicos naturais para uso conjunto com antimicrobianos, uso de anticorpos monoclonais e aplicação de moléculas para mimetizar ou alterar o *Quorum sensing* (OTTO et al., 2018; NALE & MCEWAN, 2023; SONG et al., 2024).

A utilização de bacteriófagos nos últimos anos vem ganhando espaço nas pesquisas e se mostrado promissora no tratamento da mastite bovina (BROUILLETTE et al., 2023; SONG et al., 2024). Bacteriófagos são vírus com alvos celulares específicos que infectam bactérias e não apresentam riscos para humanos, animais e demais bactérias que não as do alvo pretendido (BROUILLETTE et al., 2023). Tais vírus podem ter dois tipos de ciclos distintos, o lisogênico, capaz de inserir seu material genético no cromossomo bacteriano ou ciclo lítico, capaz de lisar a célula hospedeira. Diversos fagos já foram isolados em laboratórios de pesquisa para utilização no tratamento da mastite, em maior número para *S.aureus*, mas também para outros agentes como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxitoca*, e *Aerococcus viridans* (NALE & MCEWAN, 2023).

Fagos podem ser utilizados em três distintas estratégias: aplicação de um único fago, combinação sinérgica com antimicrobianos ou em um cocktail de dois ou mais fagos (SONG

et al., 2021). Esses vírus possuem a capacidade de desestabilizarem a matriz extracelular, possibilitando a ação de medicamentos e do sistema imune (SREY et al., 2013; NALE & MCEWAN, 2023). Também podem lisar bactérias dentro do biofilme por sintetizarem endolisinas que realizam lise enzimática do peptidoglicano, liberando novos fagos, aumentando a carga viral e evitando a disseminação de novos focos de infecção bacteriana (SONG et al., 2024). Com o uso de engenharia genética também é possível modificar fagos com genes de interesse para a síntese e entrega de enzimas que degradam o biofilme (SREY et al., 2013).

Diversos fatores podem influenciar a eficácia da ação de um fago, incluindo carga viral, dose e tempo de administração, presença de anticorpos neutralizantes e a especificidade do fago. Para isso, protocolos de administração necessitam ser otimizados (BROUILLETTE et al., 2023). Comercialmente, já se iniciaram os testes para a produção de cocktails de fagos contra *S.aureus* para o tratamento de mastites. Como exemplo, StaphyliseTM é um cocktail composto por cinco diferentes fagos voltados para o controle de *S.aureus*, esse se mostrou estável no leite por 24hs a 37°C e por sete dias a 4°C. Ainda, demonstrou efeito bactericida *in vitro* e nos testes intramamários mostrou melhor efetividade com a aplicação de duas doses após a infecção. Podendo também ser utilizado profilaticamente. Tornando-se uma alternativa para o uso de antimicrobianos na bovinocultura leiteira (BROUILLETTE et al., 2023)

Como uma alternativa para o aprimoramento no tratamento da mastite são as nanopartículas que podem ser utilizadas como novas ferramentas no combate de pontos específicos da patogênese da mastite como a formação de biofilmes (ALGHARIB et al., 2019). Essas microscópicas partículas que variam entre 1 a 100 nanômetros apresentam propriedades únicas que facilitam a entrega de medicamentos e aplicações antimicrobianas. São capazes de penetrar com mais facilidade na matriz extracelular, desestabilizando o biofilme e permitindo uma melhor penetração e acúmulo de antimicrobianos, reduzindo a resistência antimicrobiana e eliminando as bactérias (LANGE et al., 2021).

Podem ser utilizadas em conjunto com um ou mais de um antimicrobiano encapsulados e com desinfetantes melhorando sua entrega com melhor concentração no alvo celular e evitando a degradação do medicamento ou produto (ALGHARIB et al., 2019; SONG et al., 2024). Também, algumas nanopartículas sozinhas, como as nanopartículas de prata (AgNPs), apresentam amplo espectro antimicrobiano desarranjando a parede celular e alterando processos metabólicos essenciais. Podem também se intercalar em ácidos nucleicos e impedir a síntese proteica em ribossomos (LANGE et al., 2021; SONG et al., 2024).

Como exemplo, nanopartículas de prata já vêm sendo testadas no tratamento para

mastite e apresentam uma boa eficácia contra agentes de difícil eliminação como *Prototheca* spp. Além de terem sido avaliadas como seguras com baixa toxicidade para o tecido da glândula mamária (JAGIELSKI et al., 2018; SONG et al., 2024). Nanopartículas de cobre tem efeito similar às de prata ao gerarem espécies reativas de oxigênio, danificando células bacterianas e fúngicas. Essas em conjunto com as nanopartículas de prata podem melhorar a atividade antimicrobiana e inibir a formação de biofilmes nas infecções intramamárias (LANGE et al., 2021; SONG et al., 2024).

Outras terapias alternativas como o uso de extrato de plantas, óleos essenciais, uso de enzimas também apresentam atividades bactericidas, capacidade de inibir enzimas e a internalização intracelular e desorganizar e eliminar a formação de biofilmes (SONG et al., 2024). Extrato de plantas apresentam vantagens por sua baixa toxicidade e muitos são os possíveis extratos de plantas disponíveis. Os principais extratos eficazes já testados *in vitro* contra agentes da mastite bovina são: *Eucalyptus globulus* Labill, *Juglans regia* L, *Artemisia absinthium*, *Cymbopogon nardus*, *Rhodomyrtus tomentosa*, *Panax ginseng*, *Calliandra surinamensis*, *Xanthium strumarium*, entre outros (Zaatout et al., 2020).

Discussão e Conclusão

Medidas profiláticas de manejo ainda são as principais maneiras de prevenir e controlar o estabelecimento de infecções intramamárias e o desenvolvimento de biofilmes. Observações de alterações no leite, realização regular de testes indicadores de mastite, estabelecimento de linha de ordenha, higienização correta das instalações e equipamentos, dieta adequada que auxilie a manutenção de uma boa imunidade para a vaca junto com protocolos de vacinação, são ações preventivas que reduzem e auxiliam no controle dessa enfermidade.

Após a instalação da mastite, principalmente por *S.aureus*, o desafio de conseguir eliminar o agente devido as suas características intrínsecas de resistência antimicrobiana, produção de toxinas e formação de biofilme tornam o tratamento prolongado, repetitivo e desafiador. A característica de formação de biofilme por *S.aureus* há algumas décadas vem recebendo atenção de pesquisadores em busca de soluções que consigam compreender e desestabilizar, desorganizar, eliminar e combater esse ponto chave das infecções por *S.aureus*.

Contudo, em sua maioria, os estudos e experimentos já realizados foram voltados para pesquisas *in vitro*, o que em diversos casos não se encaixa com a clínica ou a dificuldade de eliminação do agente *in vivo*. Novas tecnologias de tratamento associadas a terapia antimicrobiana e a medidas de manejo eficazes podem trazer resultados promissores em

infecções crônicas e persistentes. A pesquisa com demais modelos animais e também estudos *in vivo* que busquem entender melhor os mecanismos utilizados pela bactéria durante a formação de biofilme e também as respostas imunológicas durante a infecção são pontos importantes para o desenvolvimento de estratégias de eliminação e produção de vacinas. Todas essas medidas, auxiliam em um desafio maior que é a prevenção da resistência antimicrobiana e redução da utilização de antimicrobianos na saúde humana e animal. Evitando riscos à saúde humana, prejuízos econômicos, redução no bem-estar animal e descarte de animais desnecessariamente.

Referências

ALAV, I., SUTTON, J. M., & RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73(8), 2003-2020. 2018. doi:10.1093/jac/dky042

ALGHARIB, S. A., DAWOOD, A., & XIE, S. Nanoparticles for treatment of bovine Staphylococcus aureus mastitis. **Drug delivery**, 27(1), 292-308. 2020.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., GAMBERINI, S., CERVELLATI, M., DONATI, E., & MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, 23(21), 4233-4239. 2002.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., RAVAIOLI, S., & MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 7. 2015.

ATSHAN, S. S., NOR SHAMSUDIN, M., SEKAWI, Z., LUNG, L. T., HAMAT, R. A., KARUNANIDHI, A., MATEG ALI, A., GHAZNAVI-RAD, E., GHASEMZADEH-MOGHADDAM, H., CHONG SENG, J. S., NATHAN, J. J., & PEI, C. P. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 976972, 2012.

AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A. R., ... & STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods. **Critical reviews in microbiology**, 43(3), 313-351. 2017.

BASELGA R, ALBIZU I, AMORENA B. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. **Vet Microbiol** 39(3-4):195-204, 1994.

BEENKEN, K. E., DUNMAN, P. M., MCALEESE, F., MACAPAGAL, D., MURPHY, E.,

PROJAN, S. J., & SMELTZER, M. S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of bacteriology**, 186(14), 4665-4684. 2004.

BROUILLETTE, E., MILLETTE, G., CHAMBERLAND, S., ROY, J.-P., STER, C., KIROS, T., HICKEY, S., HITTLE, L., WOOLSTON, J., & MALOUIN, F. Effective Treatment of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection in a Murine Model Using the Bacteriophage Cocktail StaphLyse™. **Viruses**, 15(4), 887. 2023. <https://doi.org/10.3390/v15040887>

CASTILHO, I. G., DANTAS, S. T. A., LANGONI, H., ARAÚJO, J. P., JR, FERNANDES, A., JR, ALVARENGA, F. C. L., MAIA, L., CAGNINI, D. Q., & RALL, V. L. M. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Journal of dairy science**, 100(8), 6414–6421. 2017 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12700>

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284, 1318–1322. 1999.

CHEN, L., TANG, Z. Y., CUI, S. Y., MA, Z. B., DENG, H., KONG, W. L., YANG, L. W., LIN, C., XIONG, W. G., & ZENG, Z. L. Biofilm Production Ability, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* from Various Veterinary Hospitals. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, 9(4), 264. 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040264>

CHENG W, HAN S. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments —A review. **AnimBiosci.**33(11):1699-1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156> 2020.

CUCARELLA, C., TORMO, M.A., ÚBEDA, C., TROTONDA, M.P., MONZÓN, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. AND PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, 72, 2177–2185, 2004.

DA COSTA KREWER, C., SANTOS AMANSO, E., VENERONI GOUVEIA, G., DE LIMA SOUZA, R., DA COSTA, M. M., & APARECIDO MOTA, R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 47(3), 511–518, 2014.[doi:10.1007/s11250-014-0511-5](https://doi.org/10.1007/s11250-014-0511-5)

FIDELIS, C. E., ORSI, A. M., FREU, G., GONÇALVES, J. L., & SANTOS, M. V. D. Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 11(4), 170. 2024.

FIDELIS, C. E., DE FREITAS LEITE, R., GARCIA, B. L. N., GONÇALVES, J. L., GOOD, L., & DOS SANTOS, M. V. Antimicrobial activities of polyhexamethylene biguanide against biofilm-producing *Prototheca bovis* causing bovine mastitis. **Journal of dairy science**, 106(2), 1383–1393. 2023. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22468>

FRANCISCO, M. S., ROSSI, C. C., BRITO, M. A. V. P., LAPORT, M. S., BARROS, E. M., & GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Characterization of biofilms and antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species involved with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Research**, 88(2), 179–184. 2021. doi:10.1017/S0022029921000285

FREEMAN DJ, FALKINER FR, KEANE CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J Clin Pathol**. 42:872–4, 1989.

GARZONI, C., & KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in microbiology**, 17(2), 59-65. 2009. doi: 10.1016/j.tim.2008.11.005

HENSEN, S. M., PAVIČIĆ, M. J. A. M. P., LOHUIS, J. A. C. M., & POUTREL, B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of dairy science**, 83(3), 418-429. 2000.

JAGIELSKI, Tomasz et al. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. **Nanomedicine**, v. 13, n. 9, p. 1025-1036, 2018. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0370>.

LANGE, Agata et al. Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1884, 2021.

LATORRE, A. A., OLIVA, R., PUGIN, J., ESTAY, A., NUALART, F., SALAZAR, K., & MUÑOZ, M. A. Biofilms in hoses utilized to divert colostrum and milk on dairy farms: A report

exploring their potential role in herd health, milk quality, and public health. **Frontiers in Veterinary Science**, 9, 969455. 2022.

LEE, S. H. I., MANGOLIN, B. L. C., GONÇALVES, J. L., NEEFF, D. V. D., SILVA, M. P. D., CRUZ, A. G. D., & OLIVEIRA, C. A. F. D. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 97(3), 1812-1816. 2014. doi.org/10.3168/jds.2013-7387

MAH, T. F., & O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, 9(1), 34–39. 2001. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)

MEDINA, C., MANRIQUEZ, D., GONZALEZ-CÓRDOVA, B. A., PACHA, P. A., VIDAL, J. M., OLIVA, R., & LATORRE, A. A. Biofilm Forming Ability of *Staphylococcus aureus* on Materials Commonly Found in Milking Equipment Surfaces. **Journal of Dairy Science**. 2025. doi.org/10.3168/jds.2024-25416

MELCHIOR, M. B., VAARKAMP, H., & FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? The **Veterinary Journal**, 171(3), 398-407. 2006. Doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006

MELCHIOR, M.B. Bovine Mastitis and Biofilms. In: Percival, S., Knottenbelt, D., Cochrane, C. (eds) **Biofilms and Veterinary Medicine. Springer Series on Biofilms, vol 6**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5_9

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; KOWALEWSKI, C.; KROLAK-ULINSKA, A.; MARUSZA, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Mol. Sci.** 23, 8088. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>

NALE, JANET Y.; MCEWAN, NEIL R. Bacteriophage therapy to control bovine mastitis: A review. **Antibiotics**, v. 12, n. 8, p. 1307, 2023.

NARANJO-LUCENA, A., & SLOWEY, R. Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European

countries. **Journal of Dairy Science**, *106*(1), 1-23. 2023.

OLAIMAT, A. N., ABABNEH, A. M., AL-HOLY, M., AL-NABULSI, A., OSAILI, T., ABUGHOUSH, M., & HOLLEY, R. A. A Review of Bacterial Biofilm Components and Formation, Detection Methods, and Their Prevention and Control on Food Contact Surfaces. **Microbiology Research**, *15*(4), 1973-1992. 2024.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology spectrum**, *6*(4), 2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>

PEDERSEN, R. R., KRÖMKER, V., BJARNSHOLT, T., DAHL-PEDERSEN, K., BUHL, R., & JØRGENSEN, E. Biofilm Research in Bovine Mastitis. **Frontiers in veterinary science**, *8*, 656810, 2021.

PÉREZ, V. K. C., COSTA, G. M. D., GUIMARÃES, A. S., HEINEMANN, M. B., LAGE, A. P., & DORNELES, E. M. S. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of global antimicrobial resistance**, *22*, 792– 802, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of dairyscience**, *100*(12), 10381-10397, 2017.

SCHÖNBORN, S., & KRÖMKER, V. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. **Veterinary microbiology**, *196*, 126-128. 2016.

SILVA VO, SOARES LO, SILVA JÚNIOR A, MANTOVANI HC, CHANG Y, MOREIRA MAS. Biofilm Formation on Biotic and Abiotic Surfaces in the Presence of Antimicrobials by *Escherichia coli* Isolates from Cases of Bovine Mastitis. **Appl Environ Microbiol** 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.01953-14>

SINHA, S., AGGARWAL, S., & SINGH, D. V. Efflux pumps: gatekeepers of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Microbial Cell**, *11*, 368. 2024. doi:

10.15698/mic2024.11.839

SONG, M., TANG, Q., DING, Y. *ET AL.* *Staphylococcus aureus* and biofilms: transmission, threats, and promising strategies in animal husbandry. **J Animal Sci Biotechnol** **15**, 44, 2024.

SREY, S., JAHID, I. K., & HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food control**, *31*(2), 572-585. 2013.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B. AND VLAHOVIC, M.S. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcus* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, *40*, 175–179, 2000.

TEH, K. H., FLINT, S., BROOKS, J., & KNIGHT, G. (Eds.). **Biofilms in the dairy industry**. John Wiley & Sons, 2015.

VAUTOR, E., ABADIE, G., PONT, A., & THIERY, R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal's species. **Veterinary Microbiology**, *127*(3-4), 407-411, 2008.

ZAATOUT, N.; AYACHI, A.; KECHA, M. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1102-1119, 2020.

ZUO, Jiakun et al. Difference Analysis on Virulence Genes, Biofilms and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* from Clinical and Subclinical Bovine Mastitis. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, p. 132, 2025.

Capítulo III

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Molecular and Phenotypical characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Federal District, Brazil

Molecular and phenotypical characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Federal District

ABSTRACT:

The *Staphylococcus aureus* is one of the major causes of mastitis in dairy cows worldwide. These bacteria have pathogenic potential, the ability to form biofilms on the udder and equipment, widespread antimicrobial resistance, and good adaptability to new conditions. These factors increase the importance of monitoring virulence factors and antimicrobial resistance profiles. The aim of this study was to analyze the molecular and phenotypic profile related to antimicrobial resistance, biofilm production and the presence of efflux pump genes in 35 *S. aureus* isolates obtained from raw milk samples of clinical and subclinical mastitis in the Federal District, Brazil. For this purpose, the samples were confirmed biochemically and molecularly for the presence of the specific genes *nuc* and *aroA*. Antimicrobial susceptibility was assessed by disc diffusion and PCR for *mecA*, *blaZ*, *tet(K)*, *tet(M)* and *van(A)*. Biofilm production was assessed using Congo red agar, microplate adhesion assay and PCR for *icaA*, *icaD* and *bap* genes. The *msrA*, *norA*, *tet(38)* and *qacA* efflux pump genes were also assessed. As a result, the analysis of the antimicrobial resistance profile showed greater resistance (71.42%) to the pharmacological bases linezolid, followed by penicillin G (60%) and tetracycline (37.14%). Among the isolates, 21/35 (60%) were classified as Multiple Drug Resistance. The most frequently amplified genes were *blaZ* (88.5%), followed by *tet(K)* (31.4%), while the *mecA* gene was not detected. It was observed that in the red congo agar test 21.42% were able to produce biofilm. Using the plate adhesion method, 100% of the isolates produced biofilm and were classified into 3 categories: 39.39% were able to produce biofilm strongly, 30.30% moderately and 27.27% weakly. The *icaA* gene was present in 33.33%, the *icaD* gene in 90.90% and the *bap* gene in only 9.09% of the samples evaluated. Among the efflux-related genes, the *tet(38)* and *nor(A)* genes were the most frequently amplified with 80% and 62.8% respectively. The ability to form biofilm and the antimicrobial resistance observed in some isolates in this study highlight the importance of studying and monitoring local strains *in vitro*.

Keywords: Mastitis, biofilm, antimicrobial resistance, efflux pumps.

Introduction

Mammary inflammations, known as mastitis, are responsible for causing painful and debilitating infections in lactating females. Economically, mastitis is also one of the main problems in dairy farming due to the considerable reduction in the quantity and quality of milk produced (RUEGG et al., 2017).

Mastitis can be classified as environmental or infectious depending on the microorganism isolated. One of the main pathogens involved in both infectious and subclinical mastitis is the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (RUEGG et al., 2017; PÉREZ et al., 2020). This bacterium is commonly found on the skin and respiratory tract of humans and animals and is also present in the environment. Its effect becomes worrying when it invades and colonizes tissues where it does not normally predominate, such as the bovine mammary gland (PEDERSEN et al., 2021). In this environment, strains with pathogenic potential can colonize and express virulence factors that allow, among other things, colonization of host tissues, production of toxins, greater resistance to phagocytosis, adhesion to the host cell, formation of biofilms and evasion of the immune system (PÉREZ et al., 2020; PEDERSEN et al., 2021; CAMPOS et al., 2022).

Antimicrobial resistance is characterized by the ability of a bacterium to survive a drug and subsequently replicate. This is a process that occurs naturally over time, usually due to genetic changes acquired through mutation and selection or through genetic transfer between microorganisms (BALABAN et al., 2019; PÉREZ et al., 2020). These mechanisms include antimicrobial resistance genes such as *mecA*, *mecC*, *blaZ*, which confer resistance to beta-lactam antimicrobials, *tet(K)* and *tet(M)* to tetracyclines, *erm(A)*, *erm(B)*, *msr(A)* to macrolides, *van(A)* and *van(B)* to glycopeptides, among others (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022). This multidrug resistance, caused by inappropriate use of antibiotics, has worried researchers and animal and human health professionals for decades. Multi-drugresistant strains such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), initially found only in hospitals, have now been observed in various settings such as animal production, and are known as livestock-associated MRSA, which is of concern because of the risk of contamination of the environment and the associated food chain (CUNY et al., 2015; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2023).

Other defense mechanisms associated with antimicrobial resistance are also observed in *S. aureus*, such as efflux pumps, biofilm formation and toxin production. The presence of

efflux pumps in the bacterial membrane acts as a critical defense, allowing the extrusion of toxic compounds into the external medium and can reduce the concentration and efficacy of antimicrobials inside the cell, conferring resistance to several classes of antimicrobials of clinical interest (WEBBER and PIDDOCK 2003; SINHA et al., 2024).

Biofilms are characterized by the aggregation of bacterial cells capable of producing an organic extrapolymeric matrix that covers and protects them on abiotic or biotic surfaces to which they adhere (FLEMMING et al., 2016). This is also considered a form of bacterial resistance to antimicrobial agents, as it makes it difficult for the drug to diffuse and reach the microorganism in the affected tissue, in addition to being a structure that allows better evasion of the host immune system (ARCIOLA et al., 2015; PEDERSON et al., 2020).

Its extrapolymeric matrix consists mainly of polysaccharides, proteins, lipids and extracellular DNA (eDNA). This structure allows for dynamic and complex interactions between bacteria that structurally and functionally benefit from increased hydration, better resource capture, digestive capacity, and horizontal gene transfer and protection against antimicrobials (FLEMMING et al., 2016).

Bacteria in a biofilm exhibit phenotypic characteristics related to metabolism, gene transcription and protein production that are different from those in the planktonic phase (OTTO, M., 2018). In this context, it is already known that the main genes associated with biofilm formation in *S. aureus* are related to the *ica* operon, which is responsible for the production of the polysaccharide intercellular adhesion (PIA/PNAG) composed of β -(1-6) N-acetylglucosamine. This operon consists of the *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC* genes and is regulated by the *icaR* promoter (ARCIOLA et al., 2015; PENG et al., 2023). Another gene associated with biofilm formation is the *bap* gene, which is responsible for transcribing the biofilm associated protein. The *bap* gene is not present in all *S. aureus* and is more associated with intramammary infections in cattle (CUCARELLA C. et al. 2004).

These properties are increasingly being studied because they allow the microorganism to remain in its host even after stressful events such as prolonged treatment with antibiotics. This phenomenon is known as antibiotic persistence. Such events allow entire populations or clonal subpopulations to remain in the host after effective drug treatment (BALABAN et al., 2019).

In this context, this work aims to study and analyze genotypically and phenotypically the antimicrobial resistance profile, the presence of efflux pump genes and the *in vitro* biofilm formation capacity of *S. aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis of cows from the

Federal District and its Integrated Development Region in Brazil.

Material and Methods

Bacterial strains:

The Veterinary Microbiology Laboratory of the University of Brasilia kindly provided 35 strains of *S. aureus* from raw milk, previously characterized biochemically and molecularly by the *nuc* and *aroA* genes, from the germplasm bank of the same institution (Table 1). These strains were isolated from dairy cows with subclinical and clinical mastitis, identified by the California mastitis test, score 3+ (Schalm & Noorlander, 1957), from farms in the Federal District of Brazil and surrounding areas, collected in different periods between 2012 and 2024. The bacteria were first transferred from the stock solutions to blood agar containing 5% sheep blood (Kasvi, Paraná, Brazil) and incubated at 37°C for 24 hours. The colonies were then inoculated onto mannitol agar (Himedia, India) and examined for Gram staining, positive catalase and coagulase tests. Molecular confirmation was performed by polymerase chain reaction (PCR) with amplification of the *S. aureus* specific nuclease gene (*nuc*) (KATEETE et al., 2010). ATCC 29213, ATCC 14458, USA 400 and CEFAR were used as controls in this study.

Resistance to antimicrobials

The resistance profile of *S. aureus* was determined using the disc diffusion method and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI-VET01 2015, CLSI, 2020) and manufacturers' recommendations. Discs (Netlab, Brazil) were used with the following antimicrobials (20): Penicillin G 10 UI; Oxacilin 1µg; Cefotaxime 30µg; Erythromycin 15µg; Azithromycin 15µg; Clarithromycin 15µg; Doxycycline 30µg; Minocycline 30µg; Tetracycline 30µg; Sulfazotrim (trimethoprim/sulfamethoxazole) 25µg; Gentamicin 10µg; Nitrofurantoin 300µg; Ciprofloxacin 5µg; Levofloxacin 5µg; Moxifloxacin 5µg; Clindamycin 2µg; Chloramphenicol 30µg; Rifampin 5µg; Vancomycin 30µg; Linezolid 30µg. All strains were categorized as sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R) to the tested active substances. Isolates were classified as Multi-drug- resistance (MDR) when resistant to three or more antimicrobial classes based on the criteria outlined by MAGIORAKOS et al. (2012).

DNA isolation, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Genotypic characterization

Total DNA from bacterial cells was extracted using the boiling DNA extraction method (ADWAN, K. 2014). The yield of the extraction was calculated by spectrophotometry based on the absorbance (A) at 260 nm. DNA quality was estimated using the A260/A280 ratio. Chain reactions were performed using the MasterMix Taq Pol 2x Kit (Cellco, São Paulo, Brazil).

For the genotypic evaluation of antimicrobial resistance, the following genes were studied: *mec(A)* and *blaZ* for beta-lactam resistance, *tet(M)* for tetracyclines and *van(A)* for glycopeptides. For genotypic evaluation of biofilm formation, three *S. aureus* genes involved in this activity were tested: *icaA*, *icaD* and *bap*. The genes *msrA*, *norA*, *tet(K)*, *tet(38)* and *qacA* were tested to evaluate efflux pump genes. The *CoA* gene was also tested to verify some virulence factors. The primer sequences and amplification conditions are described in Table 1 according to the methodology proposed by each author. The *S. aureus* strains ATCC 29213, ATCC 14458 and USA400 were used as positive controls. PCR products were visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and viewed under UV light.

Table1. Primers used for genotypic characterization of *Staphylococcus aureus*.

Gene	Sequence 5' - 3'	Base pairs	Reference
<i>nuc</i>	F:GCGATTGATGGTGATACGGTT R:AGCCAAGCCTTGACGAACTAAGC	279	Kateete et al. 2010
<i>mecA</i>	F:CGGTAACATTGATCGCAACGTTCA R:CTTTGGAACGATGCCTAATCTCAT	214	Murakami et al. 1991
<i>blaZ</i>	F:AAGAGATTTGCCTATGCTTC R:GCTTGACCACTTTTATCAGC	517	Sawant et al. 2009
<i>tetK</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	360	Qu et al., 2019
<i>tet(M)</i>	F - AGTGGAGCGATTACAGAA R - CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158	Qu et al., 2019
<i>van(A)</i>	F - GGGAAAACGACAATTGC R - GTACAATGCGGCCGTTA	732	Qu et al., 2019
<i>norA</i>	F:-TGCAATTTTCATATGATCAATCCC R:AGATTGCAATTCATGCTAAATATT	150	Truong-Bolduc et al., 2003
<i>tet38</i>	F: TTCAGTTTGGTTATAGACAA R:CGTAGAAATAAATCCACCTG	200	Truong-Bolduc et al., 2005
<i>msrA</i>	F:TGGTACTGGCAAAACCACAT R:AAACGTCACGCATGTCTTCA	1000	Sawant et al. 2009
<i>qacA</i>	F: ATGCCTTATATTTATTTAATAATAGCC R: ATGCGATGTTCCGAAAATGTTTAAC	321	Kaczorek-Łukowska et al., 2022
<i>icaA</i>	F :CCTAACTAACGAAAGGTAG R: AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	Vasudevan et al. 2003
<i>icaD</i>	F:AAACGTAAGAGAGGT GG R:GGCAATATGATCAAGATAC	381	Vasudevan et al. 2003
<i>bap</i>	F:CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCA C R:GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	Cucarella C et al
<i>CoA</i>	F- ATAGAGATGCTGGTACAGG R - GCTTCCGATTGTTTCGATGC	540/ 600/ 680/ 850 (variable)	Salasia et al., (2011)

Qualitative and quantitative biofilm assay

Congo red agar

Phenotypically slime-producing bacteria were identified using Congo red agar (CRA) according to the method described by Freeman et al (1989). *S. aureus* were incubated at 37°C for 24 hours under aerobic conditions. Black colonies were classified as slime-producing strains, whereas red colonies were classified as non-slime-producing strains.

Microplate adhesion method

Colonies recultured on 5% sheep blood agar were inoculated into Brain Heart Infusion broth (Himedia, India) until they reached the 0.5 McFarland turbidity standard. Cultures were transferred in triplicate to sterile 96-well straight-bottom plates (model 92096, TPP) at 200 μ L per well. A positive control sample (ATCC 29213) and sterile BHI broth were used as negative controls on all plates. Plates were incubated for 24 hours at 37°C in an oven under aerobic conditions. After this period, the contents of each well were carefully aspirated with a multichannel pipette and washed with 200 μ L of distilled water. The plates were dried for 1 hour at room temperature. The wells were then fixed with methanol for 15 minutes and allowed to dry for a further hour. The wells were then stained with 1% crystal violet solution for 15 minutes. The wells were washed and dried. The biofilm was resuspended in 33% glacial acetic acid. The optical density was read by spectrophotometry (Labsystems, Multiskan EX) using a 490 nm filter. The test was then graded according to Stepanovic et al. (2000) with some modifications. The test was performed twice, and the average optical density of each sample was calculated. The average of the negative control (OD_c) was used to classify the biofilms, and the microorganisms were classified as non-forming: OD_i \leq OD_c; Weak forming: (OD_c < OD_i \leq 2x OD_c); Moderate: 2xOD_c < OD_i \leq 4x OD_c; Strong forming: OD_i \geq 4x OD_c. (STEPANOVIC et al., 2000; DA COSTA KREWER et al., 2014).

Statistical analyzes

Associations between the variables were carried out by univariate analysis using Fisher's exact tests, $P < 0.05$ was considered significant. The Kappa test was used to assess agreement between techniques, with the Kappa coefficient varying between -1 and 1 (JACQUES, S.M.C., 2011). Statistical analyzes were performed using computer software Jamovi, Version 2.6 (Jamovi Project, 2024) and SAS® (v.9.4, Cary, North Carolina).

Results

Antimicrobial Susceptibility Testing—Phenotypic and Genotypic Assessments

Antimicrobial resistance testing of *S. aureus* isolates revealed 25/35 (71.42%) resistance to linezolid, 21/35 (60%) resistance to penicillin G, 13/35 (37.1%) resistance to tetracycline, 25/35 (71.42%) of isolates had an intermediate profile for erythromycin, 19/35 (54.2%) for clindamycin and one isolate (2.85%) was resistance to vancomycin (Table 2). Among the isolates, 21/35 (60%) were classified as MDR (resistance to one or more

antimicrobial from three or more different class of antimicrobials). The most frequently observed antibiotic resistance genes were *blaZ* 30/35 (85.7%), and *tet*(M) 14/35 (40%). The *van* (A) gene was present in 2/35 (5.7%), while the *mecA* gene was not present in any of the strains analyzed (Table 3). There was a statistical association between the *blaZ* gene and penicillin resistance ($P = 0.006$). While there was no association between the *tet*(M) gene and tetracycline resistance ($P = 0.162$).

The genes related to the efflux mechanism were also amplified in the bacterial isolates, with *tet*(38) being the most abundant with 28/35 (80%), followed by *nor*(A), 22/35 (62.85%), *qacA*, 14/35 (40%), *tet*(K), 11/35 (31.4%) and *msrA* with only 1/35 (2.85%) (Table 3). There was a positive association between the *tet*(K) gene and tetracycline resistance ($P = 0.007$) and no statistical association between the *tet*(38) and tetracycline resistance ($P = 0.689$).

The *CoA* gene was amplified in different sizes in all bacterial isolates. The size of the amplicons ranged from 400 bp to 1000 bp with the following frequencies: 400 bp (2.8%), 600 bp (48.57%), 700 bp (22.85%), 800 bp (17.14%), 900 bp (2.8%), 1000 bp (5.71%). The 600 bp pattern was the most common among the isolates (Table 3).

Table 2. Relative frequency of antimicrobial resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from Federal District, Brazil, using disc diffusion susceptibility testing.

Antibiotic class	Antibiotic disk. Concentration (µg)	<i>S.aureus</i> (n = 35)	
		Resistant	Relative frequency (%)
Beta-lactams	Penicilin G (10 UI)	21	60
	Oxacilin (1 µg)	0	0
	Cefotaxime (30 µg)	2	5.71
Macrolides	Erythromycin (15 µg)	3	8.57
	Azithromycin (15 µg)	4	11.42
	Clarithromycin (15 µg)	5	14.28
Tetracyclines	Tetracycline (30 µg)	13	37.14
	Doxycycline (30 µg)	5	14.28
	Minocycline (30 µg)	3	8.57
Sulfonamidas	Sulfazotrim (sulfametoxazol+trimetropin) (25 µg)	9	25.71
Aminoglycoside	Gentamicin (10 µg)	5	14.28
Nitrofurantoin	Nitrofurantoin (300 µg)	1	2.85
Fluoroquinolones and quinolones	Ciprofloxacin (5µg)	6	17.14
	Levofloxacin (5µg)	5	14.28
	Moxifloxacin (5µg)	12	34.28
Lincosamide	Clindamycin (2 µg)	4	11.42
Fenicol	Chloramphenicol (30 µg)	4	11.42
Glycopeptide	Vancomycin 30µg	1	2.85
Ansamycins	Rifampicin 5µg	6	17.14
Oxazolidinonas	Linezolid 30µg	25	71.42

Evaluation of biofilm formation capacity: phenotypic and genotypic analysis.

In the Congo red agar, four main phenotypes were observed in the colonies: light pink and smooth, 3/33 (9.09%); deep red and smooth, 23/33 (69.69%); black and smooth colonies (3/7) and black and dry colonies (4/7), 7/33 (21.21%), figure 1. Only the black phenotype is considered a biofilm forming colony (FREEMAN et al., 1989; ATSHAN et al., 2012). In the microplate adhesion method, all *S. aureus* colonies (35) were considered capable of biofilm formation. Of these, thirteen (37.14%) were classified as strong formers, eleven (31.42%) as moderate formers and eleven as weak formers (31.42%) (Table 3). Genotypically, twelve isolates (34.28%) were positive for the *icaA* gene, thirty one (88.57%) were positive for the *icaD* gene, and four isolates (11.42%) presented the *bap* gene while another three (8.57%) did not present any of the genes investigated. All the isolates classified as strong formers in the microplate adhesion test had the *icaD* gene, 6/13 (46,15%) had the *icaA* and *icaD* genes and only 2/13 (15,38%) had the presence of all three genes involved in biofilm formation (Table 3). However, there was no statistical association between strong biofilm formation in the adherence

test and the presence of the *icaD* or *icaA* or *bap* gene or with the tree genes together (*icaD*, *icaA* and *bap*) with values of $P=0.274$; $P=0.292$; $P=0.618$ and $P=0.0924$ respectively.

Only three isolates showed black colonies on Congo red agar and were classified as strong biofilm formers in the microplate adhesion test. Of these three isolates, one showed the presence of all three genes involved in biofilm formation. When we used the Kappa test to check the level of agreement between the Congo red agar techniques and the microplate adherence test, we found that there was only 33% agreement, with a Kappa value of -0.011. This is equivalent to agreement caused by coincidence.

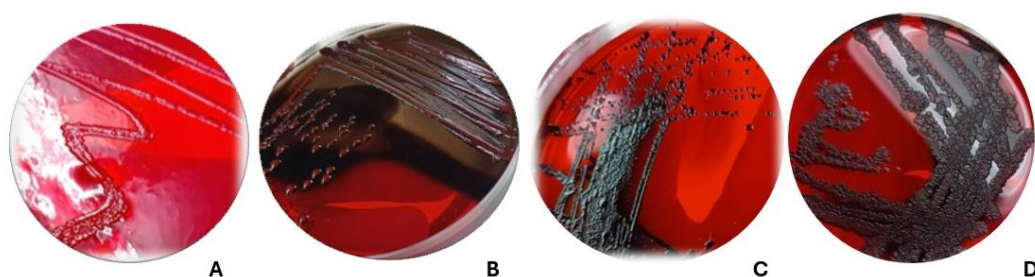


Figure 1. Cultivation of *Staphylococcus aureus* on Congo Red Agar medium after 24 hours. A. Light pink, non-biofilm-forming colony. B. Dark pink, non-biofilm-forming colony. C. Black, biofilm-forming colonies. D. Black, dry colonies, biofilm-forming.

Discussion

Staphylococcus aureus is a widely studied pathogen that causes chronic mastitis that is difficult to treat. This microorganism can express virulence factors, such as biofilm formation, and antimicrobial resistance genes that help it to adhere to and invade the mammary gland which makes treatment difficult (CAMPOS et al., 2022).

In terms of antimicrobial resistance, the MRSA and *mecA* genes were not detected in this study. 60% of the isolates evaluated were phenotypically resistant to penicillin, which is statistically consistent with the presence of the *blaZ* gene in 85.7% of the isolates. Resistance to beta-lactams is caused by the production of penicillinases (β -lactamases), enzymes capable of hydrolysing the β -lactam ring of these drugs, which in *S. aureus* are encoded by the *blaZ* gene (PÉREZ et al., 2020). For decades, studies have shown low sensitivity to penicillins by *S. aureus* and the presence of the *blaZ* gene has already been widely described in several countries (RUEGG, P., 2018). The element of penicillin sensitivity is used as a factor indicating

a higher cure rate in the treatment of mastitis (BARKEMA et al., 2006).

The bacterial isolates also showed 71.42% resistance to linezolid, 37.1% (13/35) resistance to tetracycline and an intermediate profile to erythromycin in 71.4%. Linezolid is a drug mainly used in human medicine to treat MRSA and is rarely used in veterinary medicine. *S. aureus* showing resistance to this compound are generally of human origin. This unexpected result requires further analysis, such as minimum inhibitory concentration testing, as well as a search for resistance genes such as *cfr*, which confers resistance to five different classes of antimicrobials (FETSCH, A., 2018; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022). Resistance to tetracyclines is due to three possible mechanisms: modification of the drug target, the presence of efflux pumps encoded by the plasmid gene *tet(K)* and the chromosomal gene *tet(38)*, and protection of the binding site (*tetM*). Genotypically, the observed frequency of 31.4% is statistically associated to the phenotypic resistance (37.1%). The resistance to tetracycline and the intermediate profile to erythromycin may be due to its routine use in the treatment of mastitis. These results are in line with studies carried out in Brazil (PÉREZ et al., 2020b; SILVA et al., 2023), China and Poland (REN et al., 2020; KACZOREK et al., 2022). Kaczorek et al, 2022, also observed greater resistance to beta-lactams (*blaZ* - 82%) and tetracyclines (*tet(K)* - 64%) in their analysis and found no positive *mecA*. This result is also like that of Silva et al. (2023), who studied 5 dairy farms in northeastern Brazil and obtained 188 *S. aureus*, of which 92.7% were resistant to beta-lactams, 9.95% to tetracyclines and 6.30% to erythromycin.

Specifically, one of the isolates analyzed (2.85%) was resistant to vancomycin by disc diffusion, but the *van(A)* gene was not detected by PCR. *Staphylococcus aureus* strains resistant to this drug are referred to as VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*). This resistance is attributed to the presence of genes such as *vanA* and *vanB* and is less commonly described. According to CLSI (2015), the disc test is unable to differentiate between *S. aureus* isolates susceptible to vancomycin and those intermediate to vancomycin and therefore its use is not recommended. Further analysis of this isolate is therefore required. In addition, the *van(A)* gene was detected in two other samples, but without phenotypic resistance.

Efflux pumps are a key point in antimicrobial resistance because they can eliminate or reduce the concentration of the drug inside the cell in a specific or general way, together with other compounds considered toxic. In this study, the *nor(A)* and *tet(38)* genes had the highest frequency among the isolates (62.85% and 80%, respectively). These genes are located on the bacterial chromosome and are conserved genes in *S. aureus*, with the ability to export other

substances such as dyes, disinfectants and fatty acids (tet(38)), as well as quinolones and tetracyclines (SINHA et al., 2024). A similar result was observed by Silva et al. (2023) in multidrug-resistant *S. aureus* isolates, with *nor(A)* having a frequency of 50% and the lowest frequency for the tet(38) gene being only 14.28%. Of the isolates in this study, 40% carried the *qacA* gene, a gene associated with the extrusion of disinfectants such as quaternary ammonium compounds (QACs) and chlorhexidine. This result indicates a risk as these disinfectants are widely used in post milking teat dipping and to clean the facilities.

Another strategy used by *S. aureus* to maintain itself and thus spread is polymorphism of the gene encoding the coagulase enzyme (CoA). The amplification of this gene can vary, as has been reported by different authors (REINOSO et al., 2008; SAEI et al., 2009). In our study, we observed six different amplicons patterns ranging from 400bp to 1000bp, with the 600bp pattern being the most common. SAEI et al (2009) observed five different patterns ranging from 490-850bp in their study. This polymorphism may be associated with a strategy to evade the immune system and with the predominance of a particular strain in a particular region or herd (REINOSO et al., 2008; SAEI et al., 2009).

In vitro biofilm formation can be analyzed using various techniques, of which the microplate adhesion method (MAM) and Congo red agar (CRA) are the most widely used on mastitis research (ARCIOLA et al., 2015; PEDERSEN et al., 2021). In our study, seven isolates were biofilm formers on CRA and of these, only 3 (42.85%) agreed with the MAM, The other strong formers in the MAM showed variable biofilm production in the CRA. with random statistical agreement between the techniques used. Studies have reported that despite being a simple test to perform in the laboratory, there is little agreement with other techniques and the CRA has been identified as a low sensitivity method (AGNOL et al., 2012; DACOSTA KREWER et al., 2014).

Freeman et al. (1989) described black and dry colonies as forming biofilm. However, two different phenotypes of black colonies were observed: dry (opaque) and smooth (shiny) and pink: light pink/deep red. Atshan et al. (2012) also reported this greater number of phenotypes and described another classification for black colonies (very black, black, weak black and red). Arciola et al. (2002) in a comparative study between CRA and PCR for biofilm genes (*icaA* and *icaD*) reported that this difference may be due to the consequence of experimental conditions, sugar concentration or short incubation time.

In the present study, using the microtitre plate adhesion test, 100% of the isolates were able to form biofilms, with 39.39% classified as strong formers. This finding is like data

presented in other studies. DaCosta Krewer et al. (2014), in a study of 218 isolates of *S. aureus* obtained in northeastern Brazil, observed *in vitro* by MAM that 96.3% were able to form biofilm and 25.7% were classified as strong formers. Marques et al. (2021) when studying *S. aureus* from a herd in the state of Rio de Janeiro found that all the isolates in the study (20) were classified as biofilm formers, with 55% (11/20) being classified as strong formers, 30% as moderate formers and 15% as weak formers.

The mechanism of biofilm formation by *S. aureus in vivo* in the mammary gland is still unclear (PEDERSEN et al., 2020). However, some *in vitro* studies have demonstrated the importance of icaADBC operon expression in biofilm formation through the formation of PIA. In this study, the presence of the icaD gene was observed in 90.90% of the isolates, while the icaA gene was present in 33.33%. All the strong biofilm formers had the icaD gene, which is in line with Marques et al. (2017), with a prevalence of 95%, DaCosta Krewer et al. (2014) (92.2%) and Kaczorek et al. (2022) (100%), demonstrating the importance of this gene, despite not showing a statistical association with strong biofilm formers in our work.

However, studies have already reported that this is not the only resource used at this stage of infection and that other genes, such as the *bap* gene, are important for biofilm formation in the absence of the ica operon (ARCIOLA et al., 2015; MARQUES et al., 2021; CAMPOS et al., 2022). In the present study, only 11,4% (4/35) of the isolates carried the *bap* gene, two of which were classified as strong formers (MAM). These data are in agreement with those observed by Marques et al. (2021), where only one isolate expressed the gene, and with Vautor & Thiery (2008), who found none in 262 isolates from different species (human, bovine, caprine, ovine). Vautor & Thiery (2008) comment that this gene is present in a pathogenicity island (SaPIbov2) inserted in a transposon and that its horizontal transfer to other strains may be more difficult due to its specificities with the host, making this gene not prevalent.

Animals diagnosed with *S. aureus* can have very variable cure rates (3% to 86.1%) depending on age, lactation stage, SSC, treatment time and penicillin-sensitive or penicillin-resistant strain. Older animals with high SSC contaminated with penicillin-resistant *S. aureus* have cure rates between 3% and 16.5% depending on the time of treatment (Barkema et al., 2006). Findings of multidrug-resistant and strongly biofilm-forming bacteria in isolates from intramammary infections are worrying and indicate that these isolates *in vivo* may require prolonged systemic and intramammary therapy to be eliminated or may cause persistent infections, leading to the possibility of culling the animal due to the risk of transmission to other animals. It reinforces the adoption of correct management and hygiene measures, equipment

hygiene, the importance of characterization and identification of the etiological agent and the rational use of antimicrobials.

The dataset provides valuable insights into some of the main agents of mastitis in an under-explored region of Brazil. Therefore, we can see that studies related to virulence factors, resistance mechanisms and knowledge of the mechanisms of biofilm formation, especially *in vivo*, are important for the development of new approaches to the prevention, therapy and treatment of these diseases.

Conclusions

Our results showed that the *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in the Federal District could produce biofilm *in vitro*, presenting strains with a multi-drug resistance profile and the presence of genes related to antimicrobial resistance, biofilm and efflux pumps. The isolates in question mainly had the *icaD* gene, related to biofilm formation, the *blaZ* gene, related to penicillin resistance, as well as tetracycline and quinolone resistance genes (*tetK*, *tet38*, *norA*) and the *qacA* gene, related to disinfectant resistance. No MRSA strains were observed, however, some isolates showed resistance to several drugs. Overall, these results point to a pathogenic potential in *S. aureus* isolates from this region, which suggests difficulties in treating these conditions and the possible persistence of some isolates with risks to animal and public health.

Aknowledmets

The authors would like to thank the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships awarded to Silva, A.M.

References

ADKINS, P. R., & MIDDLETON, J. R. Methods for diagnosing mastitis. **Veterinary Clinics: FoodAnimal Practice**,34(3), 479-491, 2018.

ADWAN, K. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci.**Folia Microbiol** 59, 5–8, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0259-1>

AGNOL, A. M. D., CAVALCANTE, M. B., DE FRANÇA, C. A., DA COSTA KREWER, C., DE QUEIROS, A. A., DA COSTA, M. M., BRAGANÇA, J.F.M., GIRARDINI, L. K. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite de ovelhas do Município de Chapecó-SC.**Semina: Ciências Agrárias**,34(1), 311-322, 2013.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., GAMBERINI, S., CERVELLATI, M., DONATI, E., & MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, 23(21), 4233-4239. 2002.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., RAVAIOLI, S., & MONTANARO, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 5, 7. 2015.<https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>

ATSHAN, S. S., NOR SHAMSUDIN, M., SEKAWI, Z., LUNG, L. T., HAMAT, R. A., KARUNANIDHI, A., MATEG ALI, A., GHAZNAVI-RAD, E., GHASEMZADEH-MOGHADDAM, H., CHONG SENG, J. S., NATHAN, J. J., & PEI, C. P. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 976972, 2012.

BALABAN, N.Q., HELAINE, S., LEWIS, K. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence.**Nat Rev Microbiol**, 17, 441–448, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>

BARHEMA H.W., SCHUKKEN Y.H. & ZADOKS R.N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **J. Dairy Sci.** 89(6):1877-1895, 2006.
[https://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)<PMid:16702252>

CAMPOS, B., PICKERING, A.C., ROCHA, L.S. *et al.* Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. **BMC Vet Res** 18, 115, 2022.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. **CLSI supplement M100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. **CLSI supplement VET01S**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CUCARELLA, C., TORMO, M.A., ÚBEDA, C., TROTONDA, M.P., MONZÓN, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I. AND PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, 72, 2177–2185, 2004.

CHENG W, HAN S. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Anim Biosci**.33(11):1699-1713, 2020.
DOI:<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>

CUNY, C.; WIELER, L.H.; WITTE, W. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans. **Antibiotics**, 4, 521-543, 2015. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040521>

DA COSTA KREWER, C., SANTOS AMANSO, E., VENERONI GOUVEIA, G., DE LIMA SOUZA, R., DA COSTA, M. M., & APARECIDO MOTA, R. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 47(3), 511–518, 2014. doi:10.1007/s11250-014-0752-9

FLEMMING, HC., WINGENDER, J., SZEWZYK, U.*et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol** 14, 563–575, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

FREEMAN DJ, FALKINER FR, KEANE CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J Clin Pathol.** 42:872– 4, 1989.

JACQUES, SIDIA M. CALLEGARI. Bioestatística princípios e aplicações. Porto Alegre ArtMed 2011 1 recurso online ISBN 9788536311449.

JAMOVI. The jamovi project. (Version 2.6) [Computer Software]. (2024). Disponível em : [https:// www.jamovi.org](https://www.jamovi.org)

KATEETE, D.P., KIMANI, C.N., KATABAZI, F.A., OKENG, A., OKEE, M.S., NANTEZA, A., JOLOBA, M.L. AND NAJJUCA, F.C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 9, 23. 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>

KACZOREK-ŁUKOWSKA, E.; MAŁACZEWSKA, J.; SOWIŃSKA, P.; SZYMAŃSKA, M.; WÓJCIK, E.A.; SIWICKI, A.K. *Staphylococcus aureus* from Subclinical Cases of Mastitis in Dairy Cattle in Poland, What Are They Hiding? Antibiotic Resistance and Virulence Profile. **Pathogens** 2022, 11, 1404. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121404>

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.

MARQUES, V. F., SANTOS, H. A., SANTOS, T. H., MELO, D. A., COELHO, S. M. O., COELHO, I. S., & SOUZA, M. M. S.. Expression of *icaA* and *icaD* genes in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 41, e06645, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6645>

MELLO, P. L., PINHEIRO, L., DE ALMEIDA MARTINS, L., BRITO, M. A. V. P., & DE SOUZA, M. D. L. R. β -Lactam resistance and vancomycin heteroresistance in

Staphylococcus spp. isolated from bovine subclinical mastitis. **Journal of dairy science**, 100(8), 6567-6571, 2017.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology spectrum**, 6(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>

PEDERSEN, R. R., KRÖMKER, V., BJARNSHOLT, T., DAHL-PEDERSEN, K., BUHL, R., & JØRGENSEN, E. Biofilm Research in Bovine Mastitis. **Frontiers in veterinary science**, 8, 656810., 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>

PENG, Q.; TANG, X.; DONG, W.; SUN, N.; YUAN, W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. **Antibiotics**, 12(1), 12. 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>

PÉREZ, V. K. C., COSTA, G. M. D., GUIMARÃES, A. S., HEINEMANN, M. B., LAGE, A. P., & DORNELES, E. M. S. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of global antimicrobial resistance**, 22, 792– 802, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>

PÉREZ, VERÓNICA KC et al. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 2111-2122, 2020b.

REINOSO, E. B., EL-SAYED, A., LÄMMLER, C., BOGNI, C., & ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological research**, 163(3), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.013>. 2008.

REN, Qiang et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 4, p. 3368-3380, 2020.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of dairyscience**, 100(12), 10381-10397, 2017.

RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 34(3), 413-425, 2018.

SAEI, H. D., AHMADI, M., MARDANI, K., & BATAVANI, R. A. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. *Veterinary microbiology*, 137(1-2), 202-206. 2009.

SCHALM, O. W., & NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 130(5), 199– 204, 1957.

SINHA, S., AGGARWAL, S., & SINGH, D. V. . Efflux pumps: gatekeepers of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbial Cell*, 11, 368.2024. doi: 10.15698/mic2024.11.839

SILVA, J.G., ALCANTARA A.M & MOTA R.A. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin – resistant: literature review. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(2): 223-228. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4996>

SILVA, A.T.F., GONÇALVES, J.L., DANTAS, S.T.A.; RALL, V.L.M.; DE OLIVEIRA, P.R.F.; DOS SANTOS, M.V.; PEIXOTO, R.D.M.; MOTA, R.A. Genetic and Phenotypic Characterization of Subclinical Mastitis-Causing Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics** 2023, 12, 1353. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091353>

SILVA, V.; ARAÚJO, S.; MONTEIRO, A.; EIRA, J.; PEREIRA, J.E.; MALTEZ, L.; IGREJAS, G.; LEMSADDEK, T.S.; POETA, P. *Staphylococcus aureus* and MRSA in Livestock: Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages. **Microorganisms** 2023, 11, 124.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B. AND VLAHOVIC, M.S. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcus* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 40, 175–179, 2000.

VASUDEVAN, P., NAIR, M.K., ANNAMALAI, T. AND VENKITANARAYANAN, K.S.. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, **Veterinary Microbiology**, 92, 179–185, 2003.

VAUTOR, E., ABADIE, G., PONT, A., & THIERY, R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. **Veterinary Microbiology**, 127(3-4), 407-411, 2008.

ANEXO I. Table 3. Data on the antimicrobial resistance profile, biofilm formation capacity, resistance-related genes, biofilm, efflux pumps and coagulase of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Federal District.

ID	Resistance Profile	Resistance genes	Color of colonies at 24hr (Congo Red)	Slime production (MAM) 490 nm	Confirmed biofilm-associated genes	Efflux pump genes	CoA Gene
1H	AZI,CIP,CLA,DOX,ERI,LVX,LNZ,PEN,VAN,CTX	blaZ, tet(M)	Deep red	Strong	<i>icaA,icaD,bap</i>	<i>nor(A),tet38</i>	1000
4H	PEN	blaZ	Deep red	Strong	<i>icaA,icaD</i>	<i>nor(A),tet38</i>	1000
6H	CLA	tet(M)	Deep red	Moderate	<i>icaA,icaD,bap</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K)</i>	600
9H	CIP	blaZ	Deep red	Weak	<i>icaA,icaD</i>	<i>nor(A),tet38, qacA</i>	600
24H	PEN	blaZ, tet(M)	Deep red	Moderate	<i>icaA,icaD</i>	<i>tet(38)</i>	700
30H	PEN,TET,MFX,LNZ	blaZ	Deep red	Weak	<i>icaA,icaD</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K),qacA</i>	600
31H	TET,GEN,MFX,LNZ	blaZ	Black dry	Moderate	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38</i>	600
33H	PEN,SUT,MFX,CLO,LNZ	blaZ, tet(M)	Black dry	Moderate	<i>icaD</i>	<i>tet(38)</i>	600
34H	PEN,ERI,TET,DOX,LNZ	blaZ, tet(M)	Deep red	Moderate	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K)</i>	800
35H	PEN,TET,DOX,LNZ	blaZ	Deep red	Weak	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet(K)</i>	800
37H	PEN,TET,DOX,LNZ	blaZ	Light pink	Weak	<i>icaD</i>	<i>tet(K),qacA</i>	700
38H	PEN,ERI,AZI,CLA,TET,DOX,SUT,CIP,LVX,MFX,CLI,CLO, RIF,LNZ	blaZ	Deep red	Weak	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,qacA</i>	600
41H	LNZ	blaZ, tet(M)	Deep red	Weak	-	-	600
42H	PEN	blaZ, tet(M)	Deep red	Weak	<i>icaD</i>	-	800
43H	AZI,TET,MIN,SUT,LVX,MFX,RIF,LNZ	-	Light pink	Weak	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,qacA</i>	600
48H	PEN,TET,CIP,CLO,LNZ	blaZ	Deep red	Weak	<i>icaA,icaD</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K)</i>	800
49H	PEN,MIN,GEN,NIT,LNZ	blaZ, tet(M)	Black dry	Moderate	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet(K),qacA</i>	700
52H	PEN,TET,MFX,LNZ	blaZ, tet(M)	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	<i>tet(K),tet(38)</i>	800
53H	PEN,CLA,TET,LVX,MFX,LNZ	blaZ	Deep red	Strong	<i>icaA,icaD</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K)</i>	800
55H	PEN,AZI,TET,MIN,SUT,GEN,CIP,CLI,CLO,RIF,LNZ	blaZ, tet(M)	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,qacA</i>	700
56H	PEN,TET,LNZ	blaZ	Black dry	Strong	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,tet(K),qacA</i>	600
60H	SUT,LNZ	blaZ	Smooth black	Moderate	<i>icaD</i>	-	600
61H	CLA,SUT,MFX,CLI,LNZ	blaZ	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,qacA</i>	700
62H	SUT,MFX,LNZ	blaZ, tet(M)	Deep red	Moderate	<i>icaD</i>	<i>tet(38)</i>	600
64H	SUT,RIF,LNZ	blaZ	Deep red	Moderate	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet(38)</i>	600
65H	SUT,MFX,RIF,LNZ	blaZ	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	<i>nor(A),tet38,qacA</i>	700
66H	-	-	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	<i>tet(38)</i>	600

67H	-	tet(M)	Deep red	Moderate	-	tet(38)	600
70H	PEN,GEN,LVX,MFX,RIF,LNZ	blaZ	Smooth black	Strong	<i>icaA,icaD</i>	nor(A),tet38,qacA	600
V.133	LNZ	-	Deep red	Strong	<i>icaD</i>	-	700
20058	PEN,LNZ	blaZ	Smooth black	Strong	<i>icaA,icaD,bap</i>	nor(A),tet38,qacA	600
UC1	PEN	blaZ	Deep red	Strong	<i>icaA,icaD</i>	nor(A),tet(38)	700
32C1	PEN,CTX	blaZ,tet(M),van(A)	Light pink	Moderate	-	tet(38)	900
QPDCI	PEN,TET,DOX,GEN,CLI	blaZ,van(A)	-	Weak	<i>icaA,icaD,bap</i>	Tet(38),qacA,msrA	600
QPECII	LNZ	blaZ, tet(M)	-	Weak	<i>icaD</i>	nor(A),tet(38),tet(K),qacA	400
