

Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de leite de vacas com mastite

Edmara Andrade Macedo Cruz^{1*}, Ester Dias Xavier², Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza³, Cintya Neves de Souza⁴, Carolina Magalhães Caires Carvalho⁵, Laura Francielle Ferreira Borges⁶, Franciane Gabrielle dos Santos⁷, Raphael Rodrigues Porto⁸, Daniele Pereira de Souza Borborema⁹

DOI: <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2021.35651>

Resumo

Staphylococcus aureus provenientes de leite de vacas com mastite subclínica e fenotipicamente resistentes a antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos foram testadas quanto a capacidade em produzir biofilme. Foi procedido o cultivo e análise em Ágar vermelho congo (CRA) e Teste de Aderência em Placas (AEP). Também foi avaliada a associação entre os testes CRA e AEP e a associação de cada um destes testes com a frequência das cepas potencialmente produtoras de biofilme resistentes aos beta-lactâmicos. Como resultado, 65,2% (15) dos 23 isolados testaram positivo para formação de biofilme em CRA e 60,86% (14) em AEP. Não houve associação entre os resultados do teste CRA e o teste AEP, também não houve associação com a resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (RBL). Já entre o teste de AEP e RBL houve associação. Considera-se que a capacidade em formar biofilme um poderoso mecanismo de resistência e ressalta-se a importância do controle microbiológico na produção.

Palavras-chave: Ágar vermelho congo. Aderência em Placas. Antimicrobianos.

Biofilm formation by multiresistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk from cows with mastitis

Abstract

Staphylococcus aureus strains from the milk of cows with subclinical mastitis and phenotypically resistant to antimicrobials of the beta-lactam class were tested for capacity to produce biofilm. Was carried out cultivation and analysis in Congo Red Agar (CRA) was carried out and Plate Adhesion Test (AEP). The association between CRA and AEP and

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-2493-978X>

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros – MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0001-8289-3540>

³Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-7130-3776>

⁴Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-3640-8636>

⁵Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-3145-0253>

⁶Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-1854-7077>

⁷Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-7552-3266>

⁸Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0003-1603-9615>

⁹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros – MG, Brasil.
<https://orcid.org/0000-0002-7376-586X>

*Autora para correspondência: edmaramacedo@hotmail.com

the association of each test with the frequency of potentially biofilm-producing strains resistant to beta-lactams was also evaluated. As a result, 65.2% (15) of the 23 isolates tested positive for biofilm formation in CRA and 60.86% (14) in AEP. There was no association between the results of CRA and AEP tests, nor was there an association with the beta-lactams antimicrobials resistance (RBL) test. There was an association between the AEP and RBL tests. It is considered that the ability to form biofilms is a powerful resistance mechanism and emphasizes the importance of microbiological control in production.

Keywords: Antimicrobials. Congo Red Agar. Microplate Adherence.

Introdução

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos causadores de mastite na bovinocultura (Zaatout, et al., 2020; Souza et al., 2019, Souza et al., 2020.), doença associada a prejuízos na cadeia produtiva (Cheng, et al., 2020). Na tentativa de controlar a doença no rebanho leiteiro, utiliza-se antimicrobianos de diversas classes como a dos beta-lactâmicos, porém, o uso desses agentes antimicrobianos de forma indiscriminada pode levar a multirresistência bacteriana (Ganda, et al., 2016).

A multirresistência aos agentes antimicrobianos causa uma dificuldade ainda maior no tratamento quando a bactéria é portadora de mecanismos de resistência. Um desses mecanismos envolve a formação de biofilme e vem sendo cada vez mais relatados na literatura (Shah, et al., 2019; Liu et al., 2020; Pedersen et al., 2021).

O biofilme é formado basicamente por uma comunidade séssil de células microbianas envoltas em uma matriz de substância polimérica extracelular (Shah, et al., 2019). A habilidade de formar biofilme, segundo Zaatout et al. (2020), está associada a capacidade do microrganismo persistir dentro do úbere e se proteger da resposta imune inata e adaptativa da vaca, bem como da ação de antimicrobianos que deixam de ser considerados efetivos para o tratamento.

A bactéria formadora de biofilme também pode se instalar nos equipamentos de ordenha, causando elevados gastos e prejuízos para a produção como também pode ser um perigo sanitário para o consumidor, uma vez que pode provocar doenças crônicas também em humanos (Chagas, 2015).

A detecção da formação de biofilme pode ser feita utilizando diferentes métodos fenotípicos, entre eles a verificação da produção de exopolissacarídeos pelas bactérias em meio Ágar vermelho congo (CRA) identificado por colônias negras e ásperas (Freeman, et al., 1989; Friedriczewski, et al., 2018; Shah, et al., 2019).

A eficiência do método Ágar vermelho congo (CRA) para identificação de cepas de *Staphylococcus* spp. facilidade de execução e baixo custo tornam o método indicado para rastreamento de cepas com potencial para produção de biofilmes (Cunha, et al., 2019).

Um dos métodos mais utilizados em estudos na quantificação de formação de biofilmes por bactérias *Staphylococcus* sp é o de Aderência em Placas (Shah, et al., 2019; Torres, et al., 2020; Achek et al., 2020).

As cepas capazes de produzir substâncias extracelulares poliméricas identificadas neste teste podem ter grande potencial em aderir ao tecido glandular mamário, dificultando o tratamento da mastite por antimicrobianos e a resposta imune dos bovinos leiteiros (Marques et al., 2013).

A utilização de métodos rápidos e fáceis são importantes para que bactérias produtoras de biofilmes sejam identificadas com mais rapidez e as medidas de controle e profilaxia sejam mais eficientes (Darwish e Asfour, 2013).

Pelo exposto, teve-se por objetivo rastrear isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de leite de vacas com mastite subclínica quanto à resistência a antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos e a potencialidade para produzir biofilmes através dos testes de Ágar vermelho congo (CRA) e Aderência em Placas.

Materiais e métodos

Isolados microbianos

Foram utilizados 23 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Sanidade Animal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, previamente identificados pela técnica Maldi Tofi conforme descrito por Souza et al. (2019). Os isolados foram obtidos de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica em estudos anteriores conforme os protocolos 145/2013 e 90/2018 CEUA/UFMG.

Perfil de sensibilidade a antimicrobianos beta-lactâmicos

Os 23 isolados foram testados quanto ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos por meio do método de difusão em disco seguindo protocolo descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Os antimicrobianos testados foram oxacilina (1µg), penicilina (10 µg), amoxicilina (10µg), ampicilina (10µg) e tetraciclina (30µg) da Laborclin.

Como controle positivo foi utilizado uma cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923.

Verificação da formação de biofilme em meio Ágar vermelho congo (CRA)

Culturas bacterianas criopreservadas foram ativadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e posteriormente transferidas para placas contendo o meio Plate Count Agar (PCA) utilizando-se a técnica de estrias por esgotamento em que foram incubadas a 37°C por 24 horas para isolamento das colônias.

O meio Ágar vermelho congo (CRA) foi produzido seguindo protocolo descrito por Freeman *et al.*, (1989) com adaptações, contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (0,37%), sacarose (0,50%), ágar (0,15%) e solução a 0,08% do corante Congo Red. Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, transferiu-se uma colônia de cada bactéria para placas contendo o meio CRA 0,08%, e incubadas a 37°C por 24–48 horas. O teste foi realizado em duplicata. Para o controle positivo e negativo foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente.

Verificação da formação de biofilme pelo teste de Aderência em Placas (AEP)

A aderência em Placas foi verificada segundo método descrito por Guimarães *et al.* (2012). Os 23 isolados de *Staphylococcus aureus* foram cultivados em meio TSB (Tryptone Soya Broth) por 24h a 37°C. Após este período uma porção de cada cultivo foi diluída na proporção de 1:40 em meio TSB acrescido de 0,25% de glicose. As amostras padronizadas juntamente com os controles foram colocadas em placas de hemaglutinação de 96 cavidades de fundo em “U”, em triplicata no volume de 200µL/cavidade. Após o período de incubação (37°C por 24h), as placas foram lavadas três vezes com água destilada, e deixadas secar a temperatura ambiente. Foram adicionados 200µL de cristal violeta/cavidade, e a placa foi incubada por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Após, cada cavidade foi lavada três vezes com água destilada e acrescida de álcool-acetona (80:20). As placas coradas com cristal violeta foram submetidas à espectrofotometria a 490nm para aferir as respectivas absorbâncias de cada cavidade. Os isolados que obtiveram densidade óptica igual ou menor que 0,111 foram classificados como não aderentes e os maiores que 0,111 foram classificados como aderentes.

Análise estatística

Através da análise de Qui Quadrado com $p < 0,05$ de nível de significância, avaliou-se a associação entre os testes de Ágar Vermelho Congo (CRA) e Aderência em Placas, e a associação de cada um dos testes com a frequência das cepas resistentes aos beta-lactâmicos e potenciais produtoras de biofilme.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos do perfil fenotípico de resistência e rastreamento quanto à formação de biofilme estão apresentados na Tabela 1.

No teste em meio CRA, 65,21% (15 isolados) foram identificados como potenciais formadores de biofilme. As colônias que ficaram negras, coloração característica nesse meio para produção de biofilme com um escurecimento do meio foram identificadas como positivas. As cepas não produtoras de biofilme formaram colônias vermelhas sem alteração na cor do meio, após 48 horas de incubação não houve alteração das características.

Na análise estatística de Qui Quadrado não mostrou associação entre os resultados do teste do Ágar vermelho congo (CRA) e o teste Aderência em Placas (p -valor = 1). Também não houve associação entre o teste do CRA e a Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (p -valor = 0,659).

Chagas (2015) avaliou a produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de equipamentos de ordenha mecânica utilizando os métodos de CRA e Aderência em Placas. Em seu estudo foi verificado que as cepas tiveram uma concentração de polissacarídeos variável e cada um dos compostos atua de maneira diferente na formação e patogenicidade do biofilme. O que pode explicar a não associação do teste do CRA e AEP realizados neste presente estudo.

Guimarães *et al.* (2012) também encontrou baixa concordância em seus resultados de testes para produção de biofilme em *S. aureus* multirresistentes provenientes de mastite em bovinos e bubalinos, sendo 20% dos isolados bubalinos e 26,7% dos bovinos positivos no CRA enquanto 56,6% dos isolados bubalinos e 43,3% dos bovinos foram positivos para o teste de Aderência em Placas.

Em estudos anteriores autores relataram que a interpretação do teste de CRA pode ser subjetiva pois se trata de uma análise visual, sendo necessária a inclusão de outros testes para confirmação (Szveda *et al.*, 2012; Guimarães, *et al.*, 2012; Salina, 2015).

No teste de Aderência em Placas (AEP), 60,86% (14) obtiveram densidade óptica maior que 0,111, ou seja, foram identificados como aderentes e potenciais formadoras de biofilme. Ao relacionar os resultados do teste de AEP e a resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos através da análise estatística, foi verificado associação entre estes testes (p -valor = 0,016).

Esta relação entre resistência a antimicrobianos e a formação de biofilme já foi relatada em estudos anteriores, onde isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos também obtiveram resultado positivo para formação de biofilme (Marques, 2016; Cunha, *et al.*, 2019). Os resultados de

Soares (2019) também foram significativos na expressão da produção fenotípica de biofilme pelo teste de

Aderência em Placas, onde foi relacionado a resistência antimicrobiana e produção de biofilme.

Tabela 1 – Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos e rastreamento quanto a formação de biofilme.

CEPA	OXA	PEN	AMO	AMP	TET	Vermelho Congo	Aderência em Placas
AD-05	R	R	R	R	R	+	NA
AD-9	S	R	R	R	R	-	NA
AD-10	S	R	R	R	S	+	NA
AD-12	S	R	R	R	R	-	NA
AD-15	R	R	R	R	R	+	NA
AD-32	S	R	R	R	R	+	AD
AD-34	R	R	R	R	R	+	NA
AD-39	S	R	R	R	R	-	AD
AD-41	R	R	R	R	R	+	NA
GZ-6c	R	R	R	R	R	+	NA
GZ-60A	R	R	S	R	R	-	NA
GZ-132B	R	R	S	R	R	-	AD
GZ-189A C. G	R	R	R	R	S	+	AD
GZ-LM 112 B (2)	R	R	R	R	R	+	AD
GZ-302	R	R	R	R	R	+	AD
GZ-366 (1) MENOR	R	R	R	R	R	+	AD
GZ-110 G	R	R	R	R	R	+	AD
FGO-02	R	R	R	R	R	-	AD
FM-30	R	R	R	R	R	+	AD
FSM-37	R	R	R	R	R	+	AD
FSM-38	R	R	R	R	R	+	AD
FS-71	R	R	R	R	R	-	AD
FS-75	R	R	R	R	R	-	AD
<i>S. aureus</i> ATCC 25923							Controle +
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228							Controle -

Legenda: + (Positiva para característica pesquisada); - (Negativa para característica pesquisada). Oxacilina (OXA); Penicilina (PEN); Amoxicilina (AMO); Ampicilina (AMP); Tetraciclina (TET). NA (Não aderente); AD (Aderente).

Outros autores relataram que o teste de Aderência em placas fornece resultados satisfatórios na expressão da produção fenotípica de biofilme em *Staphylococcus spp.* Este teste é recomendado para detecção de biofilme devido a sua alta sensibilidade e baixa especificidade (Melo, et al., 2012; Soares, 2019).

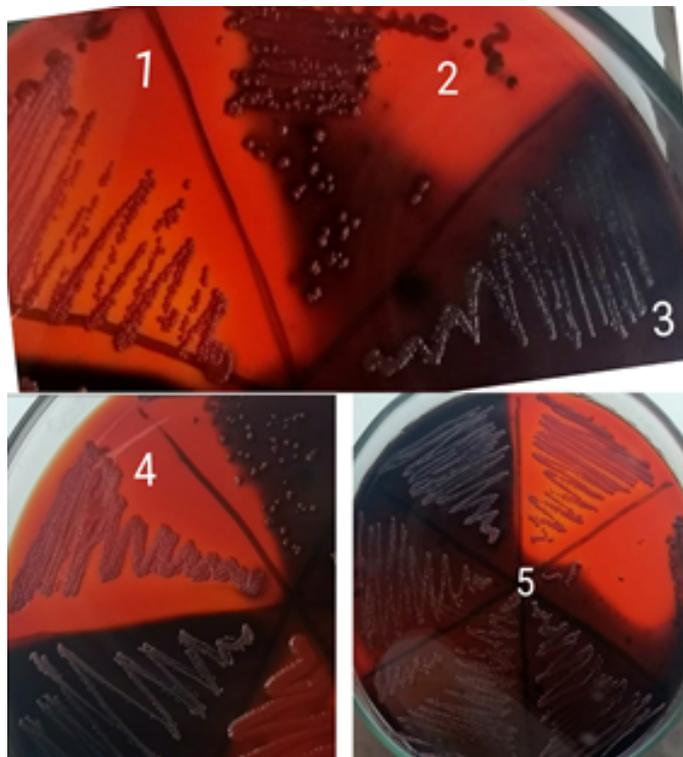
A bactéria formadora de biofilme pode ser até 10.000 vezes mais resistente que uma bactéria em sua forma planctônica devido a barreira de difusão criada

(Hamed, 2018). A matrix extracelular do biofilme afeta a eficácia do antimicrobiano devido a limitação da difusão, sendo os microrganismos produtores de biofilme

mais tolerantes a estes fármacos (Abdulmir *et al.*, 2015; Hamed, 2018). Fato este que pode explicar a relação entre a resistência aos antimicrobianos da classe dos

beta-lactâmicos e a formação de biofilme nos isolados deste presente estudo.

Figura 1 – Colônias de *S. aureus* cultivadas em meio **Ágar vermelho congo (CRA)**.



Controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228; 2: Controle positivo *S. aureus* ATCC 25923; 3: Colônia de *S. aureus* em estudo positiva para formação de biofilme; 4: Colônia de *S. aureus* em estudo negativo para formação de biofilme; 5: Colônias de *S. aureus* positivas e negativas para formação de biofilme em meio Ágar vermelho congo (CRA).

Além de dificultar a ação do antimicrobiano, a formação de biofilme também contribui para a aderência e colonização da bactéria na glândula mamária, e, consequentemente, dificulta a erradicação da bactéria na mastite bovina. Bactérias *S. aureus* formadoras de biofilme sobrevivem mais facilmente no seu hospedeiro, fazendo da sua infecção crônica e persistente (Marques *et al.*, 2016).

Conclusão

Entre as cepas de *S. aureus* estudadas, 65,21% das testaram positivo para formação de biofilme utilizando-se o teste de Ágar vermelho congo (CRA) e 60,86% no teste

de Aderência em Placas (AEP). Não houve associação entre as cepas positivas no CRA quando relacionado com os isolados resistentes a antimicrobianos beta lactâmicos e com o teste de AEP. Houve associação do teste de AEP e a resistência beta-lactâmica dos isolados estudados podendo ser explicada pela capacidade destas cepas em formar biofilme, visto que esta capacidade é um poderoso mecanismo de resistência e ressalta-se a importância do controle microbiológico na produção.

Agradecimentos

À CAPES - Código de Financiamento 001, CNPq-PIBIT, CNPq-PIBIC e Pró-Reitoria de Pesquisa - UFMG.

Referências

Abdulmir, A. S.; Jassim, S. A.; Hafidh, R. R.; Bakar, F. A. 2015. The potential of bacteriophage cocktail in eliminating Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in terms of different extracellular matrices expressed by PIA, *ciaA-D* and *FnBPA* genes. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14:1, 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0106-0>.

Achek, R.; Hotzel, H.; Nabi, I.; Kechida, S.; Mami, D.; Didouh, N.; Tomaso, H.; Neubauer, H.; Ehrlich, R.; Monecke, S.; El-Adawy, H. 2020. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria. *Pathogens*, 9(2), 153. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9020153>.

Chagas, L. G. D. S. 2015. Formação de biofilmes microbianos em diferentes materiais para equipamentos de ordenha em fazenda leiteira. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 62f. Dissertação Mestrado. DOI: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2015.306>.

- Cheng, W. N.; Han, S. G. 2020. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33:11, 1699. DOI: <https://dx.doi.org/10.5713%2Fajas.20.0156>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28. ed. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cunha, R. C.; Rosa, M. D. H. D.; Silva, C. D.; Santos, F. D. S.; Leite, F. P. L. 2019. Staphylococcal slime layers and biofilm from different origins. *Ciência Rural*, 49:05. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180783>.
- Darwish, S. F.; Asfour, H. A. 2013. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 378492. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/378492>.
- Freeman, D. J.; Falkiner, F. R.; Keane, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42:8, 872–874. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.
- Ganda, E. K.; Bisinotto, R. S.; Lima, S. F.; Kronauer, K.; Decter, D. H.; Oikonomou, G.; Schukken Y.H.; Bicalho, R. C. 2016. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific reports*, 6:1, 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep37565>.
- Guimarães, G.; França, C. A. D.; Krug, F. D. S.; Peixoto, R. D. M.; Krewer, C. D. C.; Lazzari, A. M.; Costa, M. M. D. 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 1219–1224. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001200002>.
- Hamed, M. I. 2018. Detection of Methicillin-producing *Staphylococcus aureus* in Bovine mastitis. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 8:4, 95–100. Disponível em: <https://tinyurl.com/6njdb4s2>.
- Liu, K.; Tao, L.; Li, J.; Fang, L.; Cui, L.; Li, J.; Meng, X.; Zhu, G.; Bi, C.; Wang, H. 2020. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates From Cases of Clinical Bovine Mastitis on Large-Scale Chinese Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1038. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.580129>.
- Marques, V. F. 2016. Expressão gênica na formação do biofilme e resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite mastítico bovino. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 73f. Tese Doutorado. Disponível em: <https://tede.ufrjr.br/jspui/handle/jspui/2065>.
- Marques, V. F.; Souza, M.; de Mendonça, E. C.; Alencar, T. A. D.; Pribul, B. R.; Coelho, S. D. M. D. O.; Lasagno, M.; Reinoso, E. B. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33:2, 161–170. DOI: <https://tinyurl.com/ydsaknkp>.
- Melo, P. C.; Ferreira, L. M.; Nader-Filho, A.; Zafalon, L. F.; Vicente, H. I. G. 2012. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*, 28:1, 94–99. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/12533>.
- Pedersen, R. R.; Krömker, V.; Bjarnsholt, T.; Dahl-Pedersen, K.; Buhl, R.; Jørgensen, E. 2021. Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 656810. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffvets.2021.656810>.
- Salina, A. 2015. Pesquisa dos genes icaA, icaD e bap de adesão intercelular bacteriana e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* E *Staphylococcus coagulase-negativa* isolados de mastite bovina. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 100f. Dissertação Mestrado. Disponível em: <https://tinyurl.com/45km5czt>.
- Shah, M. S.; Qureshi, S.; Kashoo, Z.; Farooq, S.; Wani, S. A.; Hussain, M. I.; Banday, M. S.; Khan, A. A.; Gull, B.; Habib, A.; Khan, S. M.; Dar, B. A. 2019. Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 64, 117-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.009>.
- Soares, K. D. A. (2019). Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos formadores de biofilmes isolados de bovinos com mastite em rebanhos leiteiros e perfil de resistência frente a desinfetantes. 2019. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 76f. Tese Doutorado. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-212810>.
- Souza, G. A. A. D.; Almeida, A. C.; Xavier, M. A. S.; Silva, L. M. V.; Sousa, C. N.; Sanglard, D. A.; Xavier, A. R. E. O. 2019. Characterization and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis. *Veterinary World*, 12, 1931-1939. DOI: www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1931-1939.
- Souza, G. A. A. D.; Carvalho, C. M. C.; Xavier, E. D.; Borges, L. F. F.; Gonçalves, S. F.; de Almeida, A. C. 2020. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica. *Brazilian Journal of Development*, 6:12, 98067–98081. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-340>.
- Szwewda, P.; Schielmann, M.; Milewski, S.; Frankowska, A.; Jakubczak, A. 2012. Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 61:1, 65–69. Disponível em: <https://tinyurl.com/f82v6y24>.
- Torres, G.; Vargas, K.; Cuesta-Astroz, Y.; Reyes-Vélez, J.; Olivera-Angel, M. 2020. Phenotypic characterization and whole genome analysis of a strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strain associated with subclinical bovine mastitis in Colombia. *Frontiers in veterinary science*, 7, 530. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffvets.2020.00530>.
- Zaatout, N.; Ayachi, A.; Kecha, M. 2020. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of applied microbiology*, 129:5, 1102–1119. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14706>.