

# Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp.* Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense

Susceptibility Profile Antimicrobial and Production “Slime” Isolates of *Staphylococcus spp.* from Cases of Bovine Mastitis in the South Fluminense Region

Caroline da Costa Noel<sup>†</sup>, Francine Silvério Motta<sup>†</sup>, Neila Lilyane da Silva Gomes Francisco<sup>‡</sup>, Nadia Rossi de Almeida<sup>‡</sup>, Lidiane de Castro Soares<sup>‡\*</sup>

## Resumo

**Como citar esse artigo.** Noel CC, Motta FS, Francisco NLFS, Almeida NR, Soares LC. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp.* Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. Revista de Saúde. 2016 Jan./Jun.; 07 (1): 22-26.

O gênero *Staphylococcus* destaca-se como um dos agentes etiológicos mais frequentes da mastite bovina, acarretando os maiores prejuízos econômicos à pecuária leiteira brasileira. O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento dos animais pode desencadear a seleção de micro-organismos multirresistentes, além de produzir resíduos no leite e derivados, intensificando os agravos à saúde pública. A formação de biofilmes é considerada uma vantagem que alguns *Staphylococcus spp.* isolados de mastite bovina possuem, facilitando a permanência dos mesmos no úbere. O objetivo deste estudo foi isolar *Staphylococcus* a partir de amostras de leite de vacas com mastite e avaliar seu perfil de resistência aos antimicrobianos e a produção de “slime”. O perfil de resistência antimicrobiana foi realizado através da técnica de disco-difusão e a produção de “slime” através do teste de aderência em microplacas. Das 216 amostras de leite analisadas, foi possível obter um total de 207 isolados de *Staphylococcus spp.*, sendo 42 *Staphylococcus* coagulase-positivos e 155 *Staphylococcus* coagulase-negativos. O maior índice de resistência foi observado para penicilina (99,5%), enrofloxacin (57%) e tetraciclina (56%). Os resultados obtidos revelaram que no teste de produção de “slime”, através da aderência em placas, 74,4% dos isolados foram positivos. Os resultados obtidos alertam para a importância do diagnóstico precoce das mastites, bem como do estudo do perfil de sensibilidade microbiana e detecção da produção de “slime”, visando êxito no tratamento de mastites.

**Palavras-chave:** Mastite bovina; Resistência antimicrobiana; “Slime”.

## Abstract

*Staphylococcus* genus stands out as one of the most common etiological agents of bovine mastitis, causing major economic losses to the Brazilian dairy industry. The indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of animals can trigger the selection of multi-resistant microorganisms, and produce residues in the milk and derivatives, increasing the risk to public health. Biofilm formation is considered an advantage for *Staphylococcus spp.* mastitis isolates, facilitating bacterial persistence in the udder. The aim of this study was to isolate *Staphylococcus* from milk samples obtained from cows with mastitis and evaluate their resistance profile to antimicrobials and the production of “slime”. The antimicrobial resistance profile was performed by disk diffusion technique and the production of “slime” by adherence test microplate. Of 216 milk samples analyzed, it was possible to obtain a total of 207 isolates of *Staphylococcus spp.*, 42 coagulase positive *Staphylococcus* and 155 coagulase-negative *Staphylococcus*. The higher resistance index was observed for penicillin (99.5%), enrofloxacin (57%) and tetracycline (56%). The results showed that 74.4% of isolates were positive to the production of “slime” through the plating adherence. The results draw attention to the importance of early diagnosis of mastitis, as well as the study of antimicrobial susceptibility profiles and detection of “slime” production, aiming at improving the success in the treatment of mastitis.

**Keywords:** Bovine mastitis; Antimicrobial resistance; “Slime”.

## Introdução

Na produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto é a mastite. Esta se caracteriza como um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como mastite clínica ou subclínica.<sup>1,2</sup>

A mastite clínica apresenta sinais evidentes de inflamação como edema, aumento de temperatura,

endurecimento, dor e pus, além de características no leite como aparecimento de grumos. Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas de inflamação do úbere e sim alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura.<sup>3</sup>

Muitos micro-organismos têm sido isolados de infecções intramamárias em bovinos entretanto, os principais agentes bacterianos envolvidos são

Afiliação dos autores:<sup>†</sup> Universidade Severino Sombra, Pró-Reitoria de Ciências da Saúde e Humanas, Curso de Biomedicina, Vassouras-RJ, Brasil.

<sup>‡</sup> Universidade Severino Sombra, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Medicina Veterinária, Vassouras-RJ, Brasil.

\* Endereço para correspondência: Universidade Severino Sombra, Av. Exped. Oswaldo de Almeida Ramos, 280 - Centro - Vassouras, RJ - CEP 27700-000.  
E-mail: biolidi@yahoo.com.br

estafilococos, estreptococos e coliformes. A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos de maior importância. Os principais reservatórios desta bactéria são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e tetos. Os *Staphylococcus aureus* e os estafilococos coagulase-negativos, têm emergido como micro-organismos causadores de mastite, sendo responsáveis pela perda da qualidade do leite, o que gera prejuízos econômicos ao produtor e à indústria leiteira.<sup>4,5</sup>

Este micro-organismo além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira apresenta resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento desta doença, sendo desta forma, de grande importância o isolamento e identificação desse agente em laboratório e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana para um melhor controle através de terapêutica adequada.<sup>6</sup>

Os antimicrobianos são ferramentas centrais nos programas de controle de mastite, portanto, o monitoramento da resistência bacteriana a esses medicamentos tem grande importância na prática veterinária. A terapia prescrita nos casos de mastites bovina é, de modo geral, ineficiente devido à grande disseminação de antibióticos nas rações, elevando o perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias envolvidas nos processos infecciosos do úbere, comprometendo, de modo significativo, a saúde do animal e sua produtividade.<sup>7</sup>

Estudos que abordam a suscetibilidade de patógenos da mastite bovina aos antimicrobianos no Brasil apontam um aumento crescente no padrão de resistência.<sup>8,9</sup> A resistência múltipla a antimicrobianos constitui-se em grande agravante na terapêutica de infecções, fazendo da mastite causada por patógenos, uma enfermidade de difícil tratamento e controle, culminando em grandes gastos econômicos.<sup>10</sup>

Os *Staphylococcus spp.* podem produzir uma série de fatores de virulência que contribuem para que a bactéria invada as defesas fagocíticas do hospedeiro, facilite a sua aderência às células epiteliais e a colonização no tecido, favorecendo a sua persistência extracelular e garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro.<sup>11,12</sup> A produção de “slime” (polissacarídeo extracelular) é um importante fator de virulência dos estafilococos coagulase negativos, permitindo-lhes aderir sobre as superfícies lisas de biomateriais, podendo formar biofilmes. O “slime” pode reduzir também a resposta imune dos fagócitos, interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro<sup>13</sup> e parece ajudar na aderência e colonização do microorganismo ao epitélio e a materiais diversos, como por exemplo, as teteiras da ordenhadeira mecânica. Os estafilococos são disseminados principalmente pelas mãos dos ordenadores ou equipamentos de ordenha, geralmente contaminados a partir do leite de animais contaminados.<sup>14</sup>

O presente trabalho foi delineado para investigar os *Staphylococcus spp.* isolados a partir de amostras de leite de vacas com mastite, bem como seu perfil de resistência antimicrobiana e produção de “slime”.

## Material e Métodos

### Coleta de Amostras

As coletas de leite foram obtidas durante visitas periódicas (fevereiro a dezembro de 2014 - fevereiro a junho de 2015) realizadas em fazendas da região Sul-Fluminense. Em cada propriedade, foram realizados testes para identificação de mastite clínica (exame físico da glândula mamária e caneca telada) e subclínica (CMT – Califórnia Mastitis Test) em todos os quartos mamários de todas as vacas suspeitas. As amostras foram obtidas imediatamente antes da ordenha, após antisepsia das tetas com álcool a 70%. Os jatos de leite foram colhidos diretamente em frascos estéreis, colocados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ para a realização dos testes de identificação bacteriana, detecção dos fatores de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

### Identificação Primária das Amostras

As amostras foram inoculadas em meios enriquecidos, seletivos e diferenciais. No isolamento primário foi utilizado ágar sangue de carneiro 5% (Difco). As colônias isoladas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e hidróxido de potássio a 3%. De acordo com as características morfológicas e de crescimento, os isolados foram inoculados em ágar Manitol Vermelho de Fenol (Difco) para melhor identificação.<sup>15</sup>

### Identificação das espécies de *Staphylococcus spp*

As colônias isoladas foram semeadas em ágar Manitol Vermelho de Fenol, meio seletivo para *Staphylococcus spp.*, para observação dos aspectos fenotípicos característicos do gênero, como a fermentação ou não do manitol. Após a realização da prova da coagulase, os estafilococos coagulase-positivos foram identificados através das provas de redução de nitratos, Voges-Proskauer, produção de urease e fermentação da maltose. Para o grupo coagulase-negativo, a identificação foi realizada através das provas de urease, fermentação de carboidratos (frutose, manose, maltose, trealose, xilose, lactose e sacarose), suscetibilidade à bacitracina, novobiocina e polimixina.<sup>15</sup>

## Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos

### Preparo do inóculo

Os *Staphylococcus spp.* isolados foram submetidos aos testes de suscetibilidade segundo os padrões do Clinical Laboratory Standart Institute.<sup>16</sup>

Os isolados foram suspensos em caldo Trypticase de soja (TSA-Merk), incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a 1,5 x 10<sup>6</sup> células/mL.

Para comparação e controle dos testes avaliados foram utilizadas as cepas padrão ATCC de *S. aureus* 25923 e ATCC de *S. aureus* 29213 obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

### Difusão em disco simples

Uma suspensão bacteriana (0,1 mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo ágar Müller Hinton (Merck) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros, conforme a literatura.<sup>17</sup>

### Discos de antimicrobianos

A eficácia comparativa da penicilina (10UI), oxacilina (1µg), cefoxitina (30µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), ceftriaxona (30µg), cefalotina (30µg), imipenem (10µg), vancomicina (30µg), gentamicina (10µg), azitromicina (15µg), eritromicina (15µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (10µg) (SENSIFAR-CEFAR®) foram analisadas para todos os isolados.

### Detecção Fenotípica da Produção de “slime” em microplaca

Os isolados foram semeados em ágar sangue por 24h a 37°C e as colônias foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo caldo tripticase soja (Merck) a 0,24% de glicose, e novamente incubadas por 24h. Após crescimento bacteriano o caldo foi descartado vertendo-se a microplaca. Os poços foram lavados com água destilada e corados com fucsina por 30 minutos em temperatura ambiente. A produção de “slime” foi observada como uma película aderida à ao

fundo da placa.<sup>18</sup> Os resultados foram avaliados através de leitura visual segundo a escala: ausente (-), fraco (+), moderado (++) e forte (+++). Para controle positivo do teste foi utilizada a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

## Resultados

Das 216 amostras de leite mastístico avaliado, foi possível obter um total de 207 isolados de *Staphylococcus spp.*, sendo 42 *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECP) e 155 *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN). A Tabela 1 relata o padrão de distribuição das espécies de *Staphylococcus* isoladas.

**Tabela 1.** Distribuição das espécies de *Staphylococcus*.

Espécie isolada	Número de isolados
<i>Staphylococcus xylosus</i>	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	38
<i>Staphylococcus aureus</i>	23
<i>Staphylococcus intermedius</i>	19
<i>Staphylococcus simulans</i>	17

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição foi avaliado através da medição do tamanho, em milímetros, da área de inibição dos antibióticos. Foi detectada resistência a praticamente todos os antibióticos testados, com exceção da vancomicina e imipenem. A Tabela 2 demonstra o percentual de resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus spp.* avaliados.

**Tabela 2.** Percentual de resistência antimicrobiana frente aos isolados testados.

Antibiótico Testado	Percentual de Resistência Antimicrobiana (n=207)
Penicilina	99,5%
Enrofloxacina	57%
Tetraciclina	56%
Ciprofloxacina	43%
Cefoxitina	37,7%
Oxaciclina	26,1%
Ceftriaxona	21,7%
Ampicilina+Sulbactam	13,5%
Azitromicina	17,9%
Eritromicina	17,9%
Gentamicina	14,9%
Cefalotina	14,9%

Os maiores índices de resistência foram observados para penicilina (99,5%), enrofloxacina (57%) e tetraciclina (56%). Verificou-se índices de resistência inferiores a 20% para cefalotina, gentamicina, azitromicina, eritromicina e ampicilina+sulbactam.

A produção de “slime” na técnica da microplaca, foi detectada em 74,4% dos isolados, sendo 65% classificado como forte produtor e 35% como fraco produtor. Foi possível observar que diferentes espécies de *Staphylococcus* produziram “slime” (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número de isolados de *Staphylococcus spp* produtores de “slime”.

Espécie isolada	Número de “slime” positivo (n=154)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	90
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	27
<i>Staphylococcus simulans</i>	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10

## Discussão

A frequência de 74,9% (155/207) de ECN nos rebanhos estudados no presente trabalho fornece aporte aos resultados encontrados recentemente na literatura, onde ECN tem sido identificado como causadores de mastite bovina subclínica em alguns países.<sup>19,20,21</sup> Além disso, a alta frequência de *Staphylococcus* nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e a dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes, o que acaba facilitando as infecções por esse microrganismo.<sup>21</sup>

Os maiores índices de resistência foram observados para penicilina, enrofloxacina e tetraciclina. De acordo com dados da literatura, o índice elevado de resistência à penicilina e tetraciclina pode estar relacionado ao uso intensivo de preparações contendo esses princípios ativos na rotina veterinária para o tratamento de infecções intramamárias em vacas secas ou lactantes, ou mesmo de outras patologias de causas infecciosas em rebanhos brasileiros.<sup>6</sup> Martins<sup>22</sup> relata que o crescente número de cepas resistentes à penicilina já é esperado, devido ao fato desse antibiótico ser amplamente difundido no tratamento de infecções. Resultados semelhantes foram demonstrados por Fontana<sup>5</sup> que verificou a resistência a ampicilina de 88,2% dos *Staphylococcus spp*.

O baixo percentual de resistência detectado frente à cefalotina, gentamicina, azitromicina, eritromicina e ampicilina+sulbactam indica possibilidade de tratamento das infecções intramamárias.

A resistência detectada nos isolados de *Staphylococcus* a diferentes grupos de antibióticos

usados no combate da mastite bovina, muitas vezes estão relacionadas à má utilização de determinado produto, como, por exemplo, aplicação em subdosagens ou período insuficiente de tratamento dos animais.<sup>5</sup> Desta forma, os índices de resistência oscilam quando se avalia este perfil em diferentes regiões.

Um estudo realizado em rebanhos leiteiros do município de Garanhuns/PE (2010), para determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica bovina, foi encontrado sensibilidade de 100% à cefalotina, 79 (95%) à enrofloxacina, 77 (93%) à tetraciclina, 76 (92%) à eritromicina e clindamicina, e 65 (78%) à gentamicina.<sup>23</sup>

No entanto, sabe-se que o elevado custo dos exames laboratoriais tem inibido a realização do isolamento, identificação e dos testes de sensibilidade *in vitro* dos agentes etiológicos da mastite bovina. Desse modo, na maioria das vezes, a escolha do medicamento anti-mastítico tem se baseado apenas no quadro clínico da enfermidade. Diante destes fatos, prejuízos ainda maiores têm sido experimentados pelos produtores rurais em decorrência dos insucessos obtidos no tratamento da mastite bovina.<sup>24</sup>

Os estafilococos possuem a capacidade de produzir um grande número de fatores de virulência e acredita-se que estas características possam ser responsáveis pela capacidade de adaptação da bactéria aos diferentes nichos do organismo.<sup>25</sup> Melo<sup>26</sup> ao avaliar a produção de biofilmes pela aderência em placas demonstrou que 98,9% das estirpes se aderiram à placa e foram consideradas produtoras de biofilmes. De acordo com dados da literatura, as infecções mamárias que estão associadas com a formação de biofilmes são também realçadas pela falha na sensibilidade aos antimicrobianos. Em uma célula primária epitelial mamária os testes para sensibilidade a neomicina, neomicina com penicilina, neomicina com tetraciclina, neomicina com bacitracina, e tetraciclina com bacitracina foram mais sensíveis para células não aderentes de *S. aureus* que para células aderentes.<sup>27</sup> Bactérias produtoras de biofilmes no epitélio mamário diminuem a efetividade dos antimicrobianos, por isso a detecção de *S. aureus* produtores de biofilmes têm importância no entendimento da patogenia desse agente, além de permitir uma melhor adoção de medidas de prevenção e controle.<sup>26</sup>

## Conclusões

O alto percentual de resistência detectado frente à penicilina, enrofloxacina e tetraciclina e os baixos índices de resistência frente a cefalotina, gentamicina, azitromicina, eritromicina e ampicilina+sulbactam ressaltam a importância da investigação do perfil de sensibilidade antimicrobiana nos isolados



*Staphylococcus spp* provenientes de leites mastíticos antes da indicação do tratamento a fim de reduzir perdas na produção leiteira. Desta forma, sugere-se o uso específico e consciente de antimicrobianos visando a redução da aquisição da resistência bacteriana.

## Agradecimentos

À Universidade Severino Sombra.

## Declarações

Os autores não possuem conflitos de interesse diretos ou indiretos. Esta pesquisa tem o apoio financeiro da FAPERJ (E-26/110.815/2012).

## Referências

- Zanette E, Scapin D, Rossi EM. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unesc & Ciência – ACBS*. 2010;1(1):65-70.
- Oliveira AA, Melo CB, Azevedo HC. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Ciênc. Anim. Bras*. 2009;10(1):226-230.
- Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M. Relação Entre Mastite Clínica, Subclínica Infeciosa não Infeciosa em Unidades de Produção Leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*. 2003; 9(3): 287-290.
- Andrade UVC. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 85p. 2010.
- Fontana VLDS, Giannini MJSM, Leite CQF, Miranda ET, Almeida AMF, Fontana CAP, Souza CM, Stella E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ -lactamase em *Staphylococcus aureus*. *Rev. Vet. Zoot*. 2011;17(4):552-559.
- Freitas MFL, Pinheiro Junior JW, Stamford TLM, Rabelo SSA, Silva DR, Silveira Filho VM, Santos FGB, Mota RA. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. 2005; 72(2):171-177.
- Lopes LO, Lacerda MS, Ronda JB. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microorganismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 2013;21(1):1-15.
- Neres WS, Santos OM, Tuñon GIL, Carneiro MRP. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de vacas com mastite em Scientia Plena. 2015; 11(4): 461-471.
- Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K. Molecular Typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(8): 3449-3445.
- Nader Filho A, Ferreira LM, Amaral LA, Rossi Junior OD, Oliveira RP. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. 2007; 74(1): 1-4.
- Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS. Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci*. 2011;94(7):3305-3310.
- Silva ECBF, Maciel MAV, Melo FL, Antas GGC, Neto AMB, Rabelo MA. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. *Anais Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco, Recife*. 2007;52(2):168-172.
- Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*. 2007;28(1):57-66.
- Soares LC. Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus spp*. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina. Doutorado em Ciências Veterinárias, Unuversidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 102p. 2010.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JR, Koneman Diagnostico microbiologico: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed. 1565p. Tradução/revisão técnica: Eiler Fritsch. 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fiftenth Informational Supplement. CLSI document M 100-S 21 (IBSN 1-56238-556-9). 2012.
- Kohner JP, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill FA Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-ative *staphylococcus spp.*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;3(9):2952-2961.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococcus* to medical devices. *Journal Clinical Microbiology*. 1985; 22(5): 996-1006.
- Pyoralá S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol*. 2009;134(2):3-8.
- Soares LC, Pereira IA, Pribul BR, Oliva MS, Mattos SMO, Souza MMS. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis.. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012; 32(1):692-696.
- Marques, VF, Souza MMS, Mendonça ECL, Alencar TA, Pribul BR, Coelho SM, Lasagno M, Reinoso E. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus spp.* e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*. 2013;33(2):161-170.
- Martins SCS, Martins CM, Albuquerque LMB, Fonteles TV, Rego SL, Junior GSF. Perfil de Resistencia de cepas de *Staphylococcus* coagulase positive isoladas de manipuladores de alimento. *B.CEPPA*; 2009; 27(1):155-159.
- Silva ER, Pereira AMG, Moraes WS, Santoro KR, Silva TRM. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., Salvador*. 2012; 13(3): 701-711.
- Freitas MFL, Pinheiro Junior JW, Stmford TLM, Rabelo SSA, Silva DR, Silveira Filho VM, Santos FGB, Mota RA, Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. 2005; 72(2): 171-177.
- Cruz RS. Análise do efeito do locus *agr* sobre a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 96p. 2008.
- Melo PC, Ferreira LM, Nader-Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina Biosci. J., Uberlândia. 2012; 28(1):94-99.
- Hensen SM, Pavicic MJAMP, Lohuis JACM, Hoog JAM, Poutrel B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *Journal of Dairy Science, Champaign*. 2000; 83(8):1966-1975.