



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

FORMAÇÃO DE BIOFILME E OUTROS FATORES
PATOGENICOS DE *S. AUREUS* E DEMAIS BACTÉRIAS
COCOS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE QUEIJOS
MINAS FRESCAL ARTESANALMENTE PRODUZIDOS E
COMERCIALIZADOS NO DF

YONARA SILVA GARCIA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

07/2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

FORMAÇÃO DE BIOFILME E OUTROS FATORES
PATOGENICOS DE *S. AUREUS* E DEMAIS BACTÉRIAS
COCOS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE QUEIJOS
MINAS FRESCAL ARTESANALMENTE PRODUZIDOS E
COMERCIALIZADOS NO DF

Yonara Silva Garcia de Oliveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone Peregmanis

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

07/2024



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

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E OUTROS FATORES PATOGÊNICOS DE *S. AUREUS*
E DEMAIS BACTÉRIAS COCOS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DE QUEIJOS
MINAS FRESCAL ARTESANALMENTE PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS
NO DF**

YONARA SILVA GARCIA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

SIMONE PERECMANIS, PROF^a DR^a, UnB (ORIENTADOR)

ANGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF^a DR^a, UnB (EXAMINADOR INTERNO)

PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL, PROF^a DR^a (EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA-DF, 25 DE JULHO DE 2024

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DE OLIVEIRA, Y. S. G. **Formação de biofilme e outros fatores patogênicos de *S. aureus* e demais bactérias cocos Gram-positivas isoladas de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e comercializados no DF.** Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. UnB. 2024. 45p. Dissertação de mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado 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 dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Oliveira, Yonara Silva Garcia.

Formação de biofilme e outros fatores patogênicos de *S. aureus* e demais bactérias cocos Gram-positivas isoladas de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e comercializados no DF. Yonara Silva Garcia de Oliveira; orientação de Simone Peregmanis - Brasília, 2024. 45 p: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2024.

1. Bactérias Gram-positivas. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Biofilme. 4. Fatores de virulência. 5. Resistência antimicrobiana. I. Peregmanis, S. Formação de biofilme e outros fatores patogênicos de *S. aureus* e demais bactérias cocos Gram-positivas isoladas de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e comercializados no DF.

Aos meus pais José Dangelo de Oliveira (*in memoriam*)
e Odília Correia da Silva de Oliveira, seres de honra que
formaram parte da minha essência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Simone Perecmanis pela oportunidade de realizar este trabalho, pela sua amizade e orientação; por ter me dado a oportunidade de retornar à Universidade de Brasília, instituição que muito prezo e tenho orgulho.

Agradeço à amiga e doutoranda Alice Martins por sua dedicação, paciência e carinho ao auxiliar na execução deste trabalho e pelas conversas diárias de estímulo. Aos colegas técnicos e residentes do Lab. Micro pelas suas contribuições; e demais colegas de pós-graduação e que frequentam o Lab., em especial à amiga e doutoranda Dalila Gongaza, por todo apoio fornecido desde o período de graduação e durante a pós-graduação.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Auxílio à Pesquisa da Fundação Universidade de Brasília (FUB).

Por fim, agradeço também à banca convidada Professoras Ângela Patrícia e Paula Poll por terem aceitado o convite e contribuído com a construção desta dissertação.

RESUMO

A presença de microrganismos patogênicos como o *Staphylococcus aureus* é responsável por ocasionar diversos prejuízos significativos na bovinocultura leiteira e na indústria de laticínios, devido a seus inúmeros fatores de virulência, como a formação de biofilme e resistência antimicrobiana. Biofilmes são agregados estruturados de microrganismos embebidos em uma matriz de polímeros extracelulares que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas. A formação de biofilme por bactérias é um importante fator de virulência e a sua produção está amplamente relacionada a presença de bactérias estafilocócicas e outras cocos Gram-positivas na indústria de laticínios e produção animal. A contaminação bacteriana em queijos tipo Minas frescal é facilitada por diversos fatores. Na produção artesanal utiliza-se leite cru, que sob práticas operacionais inadequadas de higiene de equipamentos das indústrias de laticínios e na presença de mastite bovina, pode conter ainda maior carga de microrganismos potencialmente patogênicos. O objetivo da pesquisa foi determinar a presença de *S. aureus* e outras bactérias cocos Gram-positivas em queijos Minas frescal produzidos de modo artesanal adquiridos na região do DF, identificar seus fatores de virulência como a capacidade de formação de biofilme in vitro, correlacionando com demais fatores de patogenicidade pesquisados, dentre eles a resistência a antimicrobianos. Foram analisadas 20 amostras de queijos Minas frescal do tipo artesanal e fracionado. A pesquisa envolveu cultura em ágar sangue e em meios seletivos; visualização por microscopia óptica; testes laboratoriais bioquímicos; teste laboratorial de Coagulase em lâmina; teste de Difusão em Disco para antibiograma; análise de formação de biofilme pelos métodos de adesão em microplaca (com 24 e 48h) e ágar vermelho Congo (CRA); e técnicas moleculares de PCR para identificação de genes *nuc* e *blaZ*. De dez amostras foram isoladas onze cepas de bactérias cocos Gram-positivas: quatro *Staphylococcus spp.*, quatro *S. aureus* (confirmados pela determinação do gene *nuc*), um *Enterococcus spp.* e dois *Streptococcus spp.* Dois *S. aureus* foram positivos para a presença do gene *blaZ* e dois foram considerados coagulase-positivos pelo teste fenotípico de Coagulase; dois *S. aureus* e um *Staphylococcus spp.* foram resistentes à penicilina G no teste de Difusão em Disco, assim como os dois *Streptococcus spp.* O *Enterococcus spp.* foi resistente a vários antibióticos, exceto aos beta-lactâmicos. A capacidade de formar biofilme pelo método CRA foi positiva para dois *S. aureus*, um *Staphylococcus spp.*, o *Enterococcus spp.* e para os dois *Streptococcus spp.* Pelo método de adesão em microplaca em 24h, com exceção do *Enterococcus spp.* que apresentou como moderada, os demais apresentaram forte capacidade de produzirem biofilme; e com 48h, a capacidade diminuiu para alguns microrganismos. A presença do gene *nuc* é um marcador

genético específico para a identificação de *Staphylococcus aureus*, auxiliando na confirmação de alguns desta espécie isolados dos queijos deste estudo; dois deles apresentaram o gene *blaZ* que está ligado à resistência a antibióticos beta-lactâmicos. A resistência à penicilina G foi observada fenotipicamente por alguns microrganismos e todos os estafilococos foram considerados como fortes na habilidade em formar biofilme. Apesar desta relação, o tamanho amostral foi pequeno para correlacionar fatores de virulência bacterianos encontrados, como a produção de biofilme, com a resistência antimicrobiana. Entretanto estudos recentes relatam tal associação e, com isso, dificuldades no tratamento de bovinos acometidos com mastite e a persistência e recorrência desta infecção, além de propiciar a contaminações de produtos lácteos levando a prejuízos das indústrias de laticínios, da produção animal e ao risco à segurança alimentar dos consumidores. O estudo forneceu base para a compreensão da habilidade de bactérias cocos Gram-positivas em produzir biofilmes, estudos in vivo e maior número de amostras, além de técnicas moleculares de avaliação de formação de biofilme e resistência antimicrobiana, seriam necessários para conclusão do grau de patogenicidade de microrganismos isolados de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e vendidos no DF. Esta pesquisa reflete a atenção que deve ser dada a melhores condições sanitárias em instalações de bovinocultura leiteira e de produção de laticínios, onde boas práticas de higiene de pequenos produtores e funcionários de fazendas e de comércios e feiras locais se fazem mais necessárias.

Palavras-chave: bactérias Gram-positivas; *Staphylococcus aureus*; biofilme; fatores de virulência; resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

The presence of pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus* is responsible for causing significant losses in dairy farming and the dairy industry, due to its numerous virulence factors, such as biofilm formation and antimicrobial resistance. Biofilms are structured aggregates of microorganisms embedded in a matrix of extracellular polymers that adhere to biotic or abiotic surfaces. Biofilm formation by bacteria is an important virulence factor and its production is largely related to the presence of staphylococcal bacteria and other Gram-positive cocci in the dairy industry and animal production. Bacterial contamination in Minas fresh cheeses is facilitated by several factors. In artisanal production, raw milk is used, which under inadequate operational hygiene practices of dairy industry equipment and in the presence of bovine mastitis, may contain an even higher load of potentially pathogenic microorganisms. The objective of the research was to determine the presence of *S. aureus* and other Gram-positive cocci bacteria in artisanally produced Minas Frescal cheeses purchased in the DF region, identify their virulence factors such as the capacity to form biofilm in vitro, correlating them with other pathogenicity factors studied, including antimicrobial resistance. 20 samples of Minas fresh cheeses of artisanal and fractionated types were analyzed. The research involved culture in blood agar and selective media; visualization by optical microscopy; biochemical laboratory tests; laboratory coagulase test on slide; disk diffusion test for antibiogram; analysis of biofilm formation by adhesion methods in microplate (with 24 and 48h) and Congo red agar (CRA); and molecular PCR techniques for identification of *nuc* and *blaZ* genes. Eleven strains of Gram-positive cocci bacteria were isolated from ten samples: four *Staphylococcus* spp., four *S. aureus* (confirmed by determination of the *nuc* gene), one *Enterococcus* spp. and two *Streptococcus* spp. Two *S. aureus* were positive for the presence of the *blaZ* gene and two were considered coagulase-positive by the Coagulase phenotypic test; two *S. aureus* and one *Staphylococcus* spp. were resistant to penicillin G in the disk diffusion test, as were the two *Streptococcus* spp. The *Enterococcus* spp. was resistant to several antibiotics, except beta-lactams. The ability to form biofilm by the CRA method was positive for two *S. aureus*, one *Staphylococcus* spp., one *Enterococcus* spp. and for the two *Streptococcus* spp. Using the adhesion method in microplates in 24 hours, with the exception of *Enterococcus* spp., which showed moderate adhesion, the others showed a strong capacity to produce biofilm; and after 48 hours, the capacity decreased for some microorganisms. The presence of the *nuc* gene is a specific genetic marker for the identification of *Staphylococcus aureus*, it helps to confirm some of this species isolated from the cheeses in this study; Two of them reported the *blaZ* gene,

which is linked to resistance to beta-lactam antibiotics. Resistance to penicillin G was observed phenotypically by some microorganisms, and all staphylococci were considered strong in the ability to form biofilm. Despite this relationship, the sample size was small to correlate bacterial virulence factors found, such as biofilm production, with antimicrobial resistance. However, recent studies report such an association and, with it, losses in the treatment of cattle affected by mastitis and the persistence and recurrence of this infection, in addition to leading to contamination of dairy products, causing losses in dairy products, animal production and risk to food safety for consumers. This study provided a basis for understanding the ability of Gram-positive cocci bacteria to produce biofilms. In vivo studies and a larger number of samples, in addition to molecular techniques for evaluating biofilm formation and antimicrobial resistance, would be necessary to determine the degree of pathogenicity of microorganisms isolated from artisanal Minas fresh cheeses produced and sold in the Federal District. This research reflects the attention that should be given to improving sanitary conditions in dairy farming and dairy production facilities, where good hygiene practices by producers and employees of farms and local businesses and fairs are more necessary.

Keywords: Gram-positive bacteria; *Staphylococcus aureus*; biofilm; virulence factors; antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	p. 12
2. OBJETIVOS	p. 14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	p.15
3.1 Descoberta do Biofilme na Microbiologia	p. 15
3.2 O que é Biofilme	p. 16
3.3 Relação dos Microrganismos com o Biofilme	p. 16
3.4 Formação do Biofilme pelas Bactérias e Importância	p. 17
3.5 Biofilmes na Natureza e Colonização Ambiental	p. 19
3.6 Biofilmes nos Seres Vivos e Infecções Médico-Hospitalares	p. 19
3.7 Biofilmes na Produção Animal e na Indústria Alimentícia	p. 21
3.8 Referências Bibliográficas	p. 23

CAPÍTULO II – PESQUISA (EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO)

RESUMO	p. 29
PALAVRAS-CHAVE	p. 30
INTRODUÇÃO	p. 30
MATERIAIS E MÉTODOS	p. 32
RESULTADOS	p. 34
DISCUSSÃO	p. 40
CONCLUSÕES	p. 43
REFERÊNCIAS	p. 44

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são agregados estruturados de microrganismos embebidos em uma matriz de polímeros extracelulares, que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas (MUHAMMAD, et al, 2020; LIU et al., 2023). A formação de biofilme por bactérias é um importante fator de virulência, uma estratégia de sobrevivência no ambiente, que proporciona às bactérias resistência a vários fatores como à antibioticoterapia e à resposta imunológica do hospedeiro (KREWER et al., 2015; RALIM et al., 2018; TUON et al., 2023).

Diversos microrganismos bacterianos estão envolvidos na formação patogênica de biofilmes, dentre eles o gênero mais pesquisado é o *Staphylococcus* spp., bactérias do tipo cocos e Gram-positivas, especialmente o *S. aureus* (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; IDREES et al., 2021; PENG et al., 2022; WU et al., 2024), mas outras espécies estão incluídas como *S. epidermidis* (SFACIOTE et al., 2019; MELLO et al., 2020; PEDERSON et al., 2021), *S. hycus*, *S. simulans*, *S. cromogenes* (MELLO et al., 2020), *S. intermedius* e *S. pseudointermedius* (GUADARRAMA et al., 2016). Outros gêneros bacterianos estudados por produzirem biofilme é o *Streptococcus* spp. (FIDELIS et al., 2024) e o *Enterococcus* spp. (SILVA et al., 2024), ambos cocos e Gram-positivos. A *Listeria monocytogenes*, também Gram-positiva, mas em formato de bacilo, é mais um microorganismo capaz de produzir biofilme (CIRKOVIC, 2021; LIU et al., 2023). E dentre as bactérias Gram-negativas encontram-se amplamente envolvidas em pesquisas a *E. coli* (RAOOF et al., 2013; LIU et al., 2023), *Salmonella* spp. (IÑIGUEZ-MORENO et al., 2018.; CIRKOVIC et al., 2021) e *Pseudomonas aeruginosa* (LIU et al., 2023).

Estes microrganismos formadores de biofilmes estão distribuídos em toda a natureza, ambientes clínicos e hospitalares, superfícies metálicas e plásticas, pele e mucosa nasal de humanos e nos animais (GUADARRAMA et al., 2016; MUHAMMAD et al., 2020; KIRAN et al., 2022), como na glândula mamária de vacas de produção leiteira; em indústrias de laticínios e em produtos de origem animal comercializados para consumo (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; WEBER et al., 2019; CRUZADO-BRAVO et al., 2019; CARVALHO et al., 2021; PEDERSON et al., CIRKOVIC et al., 2021; ZHAO et al., 2023).

Na medicina veterinária, especialmente no campo alimentar de laticínios e na produção animal, a formação de biofilmes por patógenos como o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* é amplamente significativa. O *S. aureus* é frequentemente isolado

de produtos lácteos e associado a casos de mastite bovina, causando infecções persistentes e recorrentes (MELLO et al., 2020; PEDERSON et al., 2021; RAHEEL et al., 2023; FIDELIS et al., 2024) e, assim como o *S. epidermidis*, outro agente causador de mastite bovina, são caracterizados por formarem biofilmes no úbere do animal, em equipamentos de ordenha e de processamento de leite, levando à infecção persistente dos animais da produção e deterioração dos laticínios, acarretando perdas econômicas consideráveis e comprometendo a segurança alimentar dos consumidores (MERCHAND et al., 2012; CARVALHO et al., 2021; MELLO et al., 2020; PEDERSON et al., 2021).

Além destes, há outros microrganismos relevantes na produção de biofilme bacteriano dentro da indústria alimentícia, como o *Enterococcus* spp., patógeno que pode ser isolado de produtos lácteos, como de queijos, possui a habilidade de formar biofilme e, também devido a isto, alta capacidade de resistência a antibióticos (ZHENG et al., 2020; SILVA et al., 2024). O *Streptococcus uberis* também é importante agente causador de mastite em vacas leiteiras, com alto potencial de produzir biofilme, assim como outros microrganismos, na glândula mamária, nos equipamentos de ordenha e nas superfícies de contato dos locais de processamento de laticínios (FIDELIS et al., 2024).

Na produção artesanal de queijos geralmente utiliza-se leite cru, que pode conter maior carga de microrganismos potencialmente patogênicos como o *Staphylococcus aureus* (CARVALHO et al., 2021; PEDERSON et al., 2021). A contaminação bacteriana nestes queijos, como o Minas frescal, ainda é facilitada por fatores como o elevado teor de umidade, criando um ambiente favorável para o crescimento dos microrganismos e formação de biofilmes (CARVALHO et al., 2021). Além de que, práticas inadequadas de higiene durante a produção e venda e armazenamento sem refrigeração adequada, podem levar à contaminação desses produtos (FREITAS et al., 2013; ALLAION et al., 2021; CARVALHO et al., 2021).

Neste contexto é possível entender que a formação bacteriana de biofilmes tem implicações significativas no cenário clínico e hospitalar, na produção animal e na indústria alimentícia, levando a danos na saúde animal e humana e na segurança alimentar, ocasionando prejuízos econômicos no campo da medicina veterinária por poder afetar especialmente a produção animal e a indústria de laticínios.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: analisar microbiologicamente queijos Minas frescal artesanais quanto à contaminação; entender a formação de biofilmes, em cocos Gram-positivos e associá-los a fatores de virulência.

Objetivos específicos: determinar a presença de *Staphylococcus aureus* e, também, demais bactérias de grupo semelhante (cocos Gram-positivos) em queijos Minas frescal produzidos de modo artesanal adquiridos na região do DF, e fatores de virulência, como resistência antimicrobiana e capacidade de formação de biofilme *in vitro*, correlacionando-os.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Descoberta do Biofilme na Microbiologia

A formação de biofilmes por microrganismos é um fato de notoriedade dentro da microbiologia desde séculos passados. No final do século 17, o holandês Antonie Van Leeuwenhoek observou um fenômeno no qual chamou de "animálculos" em uma superfície de dente humano, iniciando, assim, a compreensão do que depois foi denominado de biofilme microbiano. Esse cientista, conhecido por contribuir para melhorias no uso de microscópios e considerado criador da microbiologia experimental, foi o primeiro a observar e descrever esse aglomerado de microrganismos, posteriormente documentado, junto a outras notificações, em cartas à *Royal Society* de Londres em 1673, publicadas e compartilhadas com a comunidade científica (GEST, 2004). Cientificamente, no entanto, a caracterização da formação de biofilmes começou a se desenvolver a partir da segunda metade do século 20 (COSTERTON et al. 1999; LAPPIN-SCOTT et al, 2014).

Foi John William (Bill) Costerton quem foi reconhecido como o pai da pesquisa em biofilmes. Seus estudos pioneiros iniciaram na década de 1970. Esse pesquisador canadense revolucionou a compreensão sobre a vida microbiana ao demonstrar que microrganismos frequentemente existem no ambiente como comunidades organizadas denominadas biofilmes, e não apenas como células móveis livres (LAPPIN-SCOTT et al, 2014). Em 1978 Bill Costerton publicou um artigo seminal na *Scientific American* intitulado "*How Bacteria Stick*", detalhando como bactérias se aderem a superfícies e formam os biofilmes e se tornam protegidas por uma matriz extracelular (COSTERTON et al., 1978). Esse trabalho foi um desafio a visão tradicional da microbiologia da época e abriu novas linhas de investigação científica sobre biofilmes e infecções crônicas associadas a dispositivos médicos e hospitalares (COSTERTON et al., 1978; LAPPIN- SCOTT et al, 2014).

Bill Costerton fundou e dirigiu o *Center for Biofilm Engineering* na *Montana State University* nos Estados Unidos, que se tornou um centro de referência em pesquisa de biofilmes. Esse centro aborda de forma multidisciplinar sobre a formação, estrutura e impacto dos biofilmes em diversos contextos, como médicos, odontológicos, industriais, agrícolas e de engenharia. Suas pesquisas evidenciaram que bactérias produtoras de biofilmes podem exibir uma resistência maior a antibióticos e a mecanismos de defesa do hospedeiro, o que explica a dificuldade de tratar infecções crônicas em ambientes médico-hospitalares (COSTERTON et al. 1999; LAPPIN-SCOTT et al, 2014; KVICH et al. 2020).

As observações pioneiras sobre biofilme documentadas de Antonie van Leeuwenhoek em placas dentárias em 1674 e, posteriormente, avançadas e popularizadas por Bill Costerton em 1978, lançaram as bases para o estudo sobre a formação de biofilmes na microbiologia moderna, reconhecidas hoje como fundamentais para o entendimento da ecologia microbiana e a patogênese de doenças infecciosas.

3.2. O que é Biofilme

O biofilme é um aglomerado complexo de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas, embebidos em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) altamente hidratada. Essa matriz é composta principalmente por polissacarídeos, lipídeos, proteínas (polipeptídeos) secretadas e DNA extracelular. Esta estrutura biológica e bioquímica se forma como uma rede polimérica coesa e tridimensional que mantém as células interconectadas e imobilizadas, estabilizadas transitoriamente (FLEMMING & WINGENDER, 2010; LEWANDOWSKI & BEYENAL, 2017; MUHAMMAD et al., 2020).

3.3 Relação dos Microrganismos com o Biofilme

Os microrganismos no geral (bactérias, vírus, protozoários, algas e fungos) podem estar envolvidos na composição de um biofilme (LEWANDOWSKI & BEYENAL, 2017; SHARMA et al., 2023), embora somente alguns como, especialmente, as bactérias, estão diretamente relacionadas à produção dessa estrutura (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ & RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018; SHARMA et al., 2023).

Microrganismos bacterianos têm considerável capacidade de formar biofilme. O *Staphylococcus aureus*, por exemplo, é uma bactéria Gram-positiva que está frequentemente associada à produção de biofilmes em diversos ambientes e organismos vivos (IDREES et al., 2021; PENG et al., 2022; WU et al., 2024). A alta capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes contribui significativamente na cronicidade das infecções e contaminações relacionadas a dispositivos médico-hospitalares, à produção animal e a indústrias alimentícias (CARVALHO et al., 2021; PEDERSON et al., 2021; FIDELIS et al., 2024).

Fungos como a *Candida* spp. e o *Aspergillus* spp. possuem a capacidade de produzir biofilmes e, assim como as bactérias, este mecanismo os proporcionam uma série de vantagens, incluindo proteção contra agentes antifúngicos e mecanismos de defesa do hospedeiro. Estão frequentemente associados a dispositivos médicos e superfícies mucosas, formando biofilmes

em cateteres, válvulas protéticas e dispositivos orais. Também estão relacionados a gravidade de infecções pulmonares e meningites em indivíduos imunocomprometidos (KERNIEN et al., 2018).

Os vírus e protozoários não formam biofilmes diretamente, no entanto algumas espécies tem capacidade de colonizar os biofilmes bacterianos e dessa forma interagir e influenciar na sua formação, estrutura e resistência a fatores externos. Essas interações são complexas e têm implicações importantes na saúde pública, no tratamento de infecções e no controle de biofilmes em diversos ambientes (BOROWISKI & TRENTIN, 2021; PINTO et al., 2021; CHANG et al., 2022).

Os bacteriófagos, na virologia, podem infectar bactérias dentro de biofilmes alterando suas estruturas. Estudos mostraram que os fagos podem ser usados para controlar biofilmes patogênicos, uma abordagem conhecida como fagoterapia (CHANG et al., 2022). Um estudo revelou que os coronavírus (CoVs), incluindo o agente da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), se disseminam persistentemente entre os morcegos devido à sua associação com estruturas de biofilme, contribuindo para explicar questões quanto à manutenção e transmissibilidade de CoVs patogênicos (BOROWISKI & TRENTIN, 2021).

E dentre os protozoários, a *Acanthamoeba* spp., por exemplo, pode se alimentar de bactérias dentro de biofilmes bacterianos, influenciando a composição e a estrutura do biofilme (PINTO et al., 2021).

3.4 Formação do Biofilme pelas Bactérias e Importância

A formação de biofilmes é um processo complexo e altamente organizado que envolve várias etapas, desde a adesão inicial para formação da estrutura até a sua dispersão (MUHAMMAD et al., 2020). Esse processo é mediado por uma série de mecanismos biofísicos e bioquímicos e requer a produção de diversos substratos biológicos pelas bactérias, com uma expressão genética regulatória bastante funcional conferindo-lhes vantagens adaptativas significativas (SAXENA et al., 2018; WEBER et al., 2019; PENG et al., 2022).

Na etapa inicial se dá a adesão reversível. As células microbianas se aproximam e se aderem a uma superfície. Essa etapa é mediada por interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio. A adesão inicial é branda e as células podem se descolar facilmente, tornando, portanto, essa fase reversível (FLEMMING & WINGENDER, 2010; MUHAMMAD et al., 2020).

Os Genes de filamento, como *pilA* e *pilB*, são essenciais para a adesão inicial. Esses genes codificam proteínas estruturais que formam *pili* ou fimbria, estruturas filamentosas na superfície de algumas espécies bacterianas, tanto em Gram-negativos quanto em Gram-positivos, são componentes essenciais para que as células se liguem a superfícies e formem os biofilmes (PROFT & BAKER, 2008; REZAEI et al., 2020).

Na etapa seguinte se dá a adesão irreversível. As células começam a produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também denominadas de exopolissacarídeos ou *slimes*, que as fixam de forma permanente à superfície (SHARMA et al., 2023). A matriz EPS é uma rede tridimensional composta por polissacarídeos, incluindo alginato e celulose; lipídios, que auxiliam na adesão e proteção das células; DNA extracelular, contribuindo para a estrutura e a resistência do biofilme; e proteínas, nas quais participam enzimas que degradam a matriz, adesinas, proteínas sinalizadoras e as proteínas ácido cíclico-di-GMP (c-di-GMP) que regulam a transição da adesão reversível para irreversível. Essa rede biológica complexa protege as células que a deu origem e facilita a comunicação intercelular. (FLEMMING & WINGENDER, 2010; YI et al., 2019; MUHAMMAD et al., 2020).

Posteriormente, na fase de maturação, o biofilme se desenvolve em uma estrutura complexa com canais de água que permite o transporte de nutrientes e remoção de resíduos (FLEMMING & WINGENDER, 2010; MUHAMMAD et al., 2020). Essa etapa é mediada por um mecanismo microbiano denominado “*quorum sensing*” (QS), um sistema de comunicação autorregulado que detecta a densidade populacional bacteriana e permite coordenar a sua composição e comportamentos coletivos (MUKHERJEE & BASSLER, 2019), o que regula o contingente celular do biofilme. Outro papel do QS é regular a expressão de genes de virulência e resistência dentro dos biofilmes, permitindo a adaptação às condições ambientais adversas (SUBRAMANI & JAYAPRAKASHVEL, 2019; WANG et al., 2022). Nessa etapa, participam moléculas de sinalização como as acil-homoserina lactonas (AHLs) e autoindutores peptídicos (ZHU et al., 2019; MUHAMMAD et al., 2020).

Por último, se dá a fase de dispersão do biofilme, quando as células se desprendem para colonizar novas superfícies. Esse mecanismo de degradação da matriz EPS se dá pela atividade de enzimas específicas, como a dispersina B; regulação negativa de c-di-GMP e aumento da expressão de genes de motilidade (YI et al., 2019; MUHAMMAD et al., 2020; PARK & SAUER, 2023). Esta fase oferece grandes vantagens para as bactérias que, além da colonização de novos nichos, incluem propriedades de evasão de condições adversas, redução da

competição, propagação de infecções e diversificação genética. Essas estratégias complexas de dispersão são essenciais para a sobrevivência e proliferação bacteriana em ambientes diversos (GUILHEN et al., 2017).

3.5 Biofilmes na Natureza e Colonização Ambiental

Os biofilmes oferecem papéis benéficos em uma variedade de campos, incluindo aplicações em cultivo de plantas, degradação de produtos tóxicos, tratamento de águas residuais e inibição de corrosão de solo, entre outros (MUHAMMADA et al., 2020). Na ecologia, os biofilmes desempenham um papel essencial na funcionalidade dos ecossistemas naturais, influenciando processos biogeoquímicos, interações microbianas e ciclos de nutrientes (FLEMMING & WUERTZ, 2019; BESEMER, 2015; DANG & LOVELL, 2016).

Em ambientes aquáticos, rios e oceanos, biofilmes se formam em superfícies submersas, como pedras, sedimentos e plantas aquáticas. Eles são fundamentais para a ciclagem de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo; para a remoção de poluentes e suporte à biodiversidade microbiana, facilitando interações entre bactérias, algas e outros microrganismos; promovendo a produtividade e estabilidade dos ecossistemas aquáticos (DANG & LOVELL, 2016).

Em ambientes terrestres os biofilmes se instalam nas superfícies das partículas do solo e na rizosfera, região do solo entremeada pelas raízes de plantas, onde são vitais para a saúde do solo e a produtividade das plantas (BESEMER, 2015).

3.6 Biofilmes nos Seres Vivos e Infecções Médico-Hospitalares

A presença dos biofilmes pode resultar na infecções persistentes e complicações clínicas significativas de animais e humanos (LEDWOCH et al., 2018; KVICH et al., 2020; SENTENAC et al., 2021). Principalmente em ambientes hospitalares os biofilmes presentes nas superfícies, dispositivos médicos, como cateteres, próteses, válvulas cardíacas e implantes ortopédicos, e sistemas de água podem servir como reservatórios de patógenos, levando a infecções nosocomiais (KVICH et al., 2020; SENTENAC et al., 2021). (LEDWOCH et al., 2018; NUNEZ et al., 2023).

As bactérias mais comuns incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que normalmente estão associados a biofilmes mistos (KVICH et al., 2020). Biofilmes mistos em infecções crônicas apresentam uma maior resistência antimicrobiana devido à presença de múltiplas espécies que podem proteger umas às outras e

contribuir ainda mais para a resistência a antibióticos (KVICH et al., 2020; ASSEFA & AMARE, 2022). Infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística frequentemente envolvem biofilmes mistos de *Pseudomonas aeruginosa* e outros patógenos, exacerbando a doença (HOIBY et al., 2017).

Biofilmes são detectados também em grande parte das feridas crônicas em humanos. A matriz auto protetora que forma, dificulta a penetração de antibióticos e a resposta imunológica do hospedeiro, contribuindo para a persistência das infecções e impedindo a cicatrização adequada (DIBAN et al., 2023; WACHTER et al., 2023). O *Staphylococcus aureus* é um patógeno importante que coloniza a pele e as mucosas e é frequentemente responsável por infecções cutâneas na presença de feridas (DIBAN et al., 2023; PAPADOPOULOU et al., 2023). As infecções por *S. aureus*, especialmente as causadas por cepas resistentes a meticilina (MRSA), apresentam desafios terapêuticos significativos devido à sua resistência a múltiplos antibióticos (PAPADOPOULOU et al., 2023).

Os biofilmes de *Streptococcus pneumoniae* estão associados a doenças invasivas como pneumonia e meningite. A formação de biofilmes no epitélio respiratório pode facilitar a transição de uma colonização assintomática para uma infecção ativa, contribuindo para a disseminação bacteriana e a invasão de tecidos mais profundos. Os biofilmes conferem, ainda, uma proteção adicional às bactérias contra antibióticos, tornando as infecções por *S. pneumoniae* mais difíceis de tratar (HAMEED et al., 2021). A patogênese da meningite neonatal e em adultos imunocomprometidos causada pelo *Streptococcus agalactiae* está diretamente associada à formação de biofilmes. Essas estruturas permitem que as bactérias evitem a detecção pelo sistema imunológico e persistam nos tecidos do hospedeiro, facilitando a invasão e a infecção do sistema nervoso central (REZAEI et al., 2020).

A placa dental é um tipo específico de biofilme que se forma na superfície de dentes e gengivas, composta principalmente por bactérias, como o *Streptococcus mutans* (EMELA et al., 2020). A fermentação de açúcares pelas bactérias da placa produz ácidos que desmineralizam o esmalte dental. O biofilme dental, dessa forma, está relacionado à formação de cárie dentária e doenças periodontais, como gengivite e periodontite, afetando os tecidos de suporte dos dentes. (MORITA et al., 2016).

A formação de biofilmes bacterianos em humanos, ambientes médicos, hospitalares e odontológicos está intimamente relacionada a várias doenças infecciosas persistentes e à resistência antimicrobiana (KVICH et al., 2020; ASSEFA & AMARE, 2022). A matriz de EPS

dos biofilmes protege as células bacterianas contra o sistema imunológico do hospedeiro e a ação de antibióticos, tornando o tratamento de infecções crônicas um desafio (ASSEFA & AMARE, 2022).

3.7 Biofilmes na Bovinocultura Leiteira e na Indústria Alimentícia

Na medicina veterinária, significativamente na área de produtos alimentícios e na produção animal, a formação de biofilmes por bactérias é altamente relevante. Patógenos como bactérias estafilocócicas são os maiores responsáveis por acometer a saúde dos animais e a segurança dos alimentos de origem animal devido a seus inúmeros fatores de virulência, mas outras bactérias estão envolvidas e a capacidade de produzir biofilme é frequentemente identificada e estudada (KREWER ET AL., 2015; CRUZADO- BRAVO et al., 2019; SFACIOTTE et al., 2019; LIU et al., 2023; FIDELIS et al., 2024).

O *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos (CoNS) são formadores de biofilmes na glândula mamária bovina afetada pela mastite. A matriz de EPS produzida protege as bactérias contra as defesas do hospedeiro e tratamentos antimicrobianos, tornando ainda mais difícil a recuperação dos animais (SFACIOTTE et al., 2019). A expressão de genes de *operon icaA* foi identificada como crucial para a formação de biofilmes em isolados de *S. aureus* e CoNS. Genes como *icaA* e *icaD* foram detectados em vários microrganismos bacterianos, indicando sua importância na formação de biofilmes (CRUZADO-BRAVO et al., 2019; SFACIOTTE et al., 2019).

S. aureus e *Streptococcus uberis* são patógenos comuns em mastites bovinas e estão envolvidos na produção de biofilmes (PEDERSON et al., 2021). Essas estruturas protegem as bactérias da resposta imune do hospedeiro e da antibioticoterapia, contribuindo para a persistência de infecções e a dificuldade de tratamento (SFACIOTTE et al., 2019; PEDERSON et al., 2021; FIDELIS et al., 2024). Tanto o *S. aureus* quanto *S. uberis* possuem alta capacidade de formar biofilmes, o que proporciona uma característica crítica para sua virulência e persistência nas glândulas mamárias de vacas leiteiras acometidas pela mastite (FIDELIS et al., 2024).

Os biofilmes formados por estafilococos podem ocasionar problemas não apenas durante o tratamento da mastite bovina, mas também e, conseqüentemente, representa um grande risco para produção de laticínios, como o queijo (CRUZADO-BRAVO et al., 2019; FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; CARVALHO et al., 2021). Uma alta diversidade bacteriana foi identificada em máquinas de ordenha de fazendas leiteiras, todas pertencentes aos filos

Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. A presença de biofilmes por esses microrganismos foi demonstrada em vários materiais, incluindo aço inoxidável e plástico, utilizados na estrutura de máquinas de ordenha e de processamento dos laticínios (WEBER et al., 2019).

A contaminação de queijos Minas frescal por bactérias é propiciada por fatores como o elevado teor de umidade, criando um ambiente favorável para o crescimento desses microrganismos e práticas inadequadas de higiene durante a produção e venda e armazenamento sem refrigeração adequada, podem levar à contaminação desses produtos (FREITAS et al., 2013; ALLAION et al., 2021). Para a produção do queijo artesanal geralmente é utilizado leite cru, que pode conter maior carga de microrganismos potencialmente patogênicos como o *Staphylococcus aureus* (CARVALHO et al., 2021; PEDERSON et al., 2021). Além disso, foi demonstrado formação de biofilmes por *S. aureus* em superfícies de embalagem de queijos Minas frescal que, mesmo sob refrigeração recomendada, protege esse patógeno de fatores externos e permite a persistência e disseminação da contaminação (CARVALHO et al., 2021). Ainda, foi evidenciado *S. aureus* isolados de queijos muçarela formando biofilmes nas superfícies de contato de manipulação do produto; favorecendo à proteção desse microrganismo de diversos desinfetantes, aumentando o risco de contaminação e persistência do patógeno nos laticínios (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018). Isso implica a necessidade de protocolos de limpeza e sanitização em equipamentos de processamento de laticínios mais rigorosos (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; LIU et al., 2023).

Diversos outros microrganismos capazes de produzir biofilme estão relacionados à indústria de laticínios e a outros produtos de origem animal, como carne bovina, frango, ovos e frutos do mar. Dentre eles, as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *E. coli* (LIU et al., 2023). Esses patógenos em superfícies de contato com os alimentos representam um risco significativo para a segurança alimentar, especialmente devido à resistência contra desinfetantes e antimicrobianos que os biofilmes, quando formados, são capazes de ocasionar. Isso acarreta perdas econômicas consideráveis e compromete a segurança alimentar podendo levar a infecções persistentes e difíceis de erradicar (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; PEDERSON et al., 2021; LIU et al., 2023).

3.8 Referências Bibliográficas

- ALLAION, J. R. et al., Assessing the Microbiological Safety Parameters of Minas Artisanal Cheese Samples in Retail Environments in São Paulo, Brazil. *Appl. Sci.*, v. 11, 2021. DOI:10.3390/app11199331
- ASSEFA, M. & AMARE, A., Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infection and Drug Resistance*, V. 31, P. 5061-5068, 2022. DOI:10.2147/IDR.S379502
- BESEMER, K., Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems, *Research in Microbiology*, V. 166, P. 774-781, 2015. DOI:10.1016/j.resmic.2015.05.006
- BOROWISKI, R. G. & TRENTIN, D. S., Biofilms and Coronavirus Reservoirs: a Perspective Review. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 87, 2021. DOI:10.1128/AEM.00859-21
- CARVALHO, L. G. et al., Staphylococcus aureus biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging. *International Journal of Dairy Technology*, v. 3, 2021. DOI:10.1111/1471-0307.12783
- CHANG, C. et al., Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.
- CIRKOVIC, I. Biofilms in the food industry – impact on human health. *IOP Con. Ser. Earth Environ. Sci.*, v. 1, 2021. DOI:10.1088/1755-1315/854/1/012015
- COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 5418, p. 1318-1322, 1999. DOI:10.1126/science.284.5418.1318.
- COSTERTON, J. W., How Bacteria Stick. *Scientific American*, v. 238, p. 86-95, 1978.
- CRUZADO-BRAVO, M. L. M. et al., Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococcus spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. *Food Research International*, v. 122, p. 450-460, 2019. DOI:10.1016/j.foodres.2019.04.017
- DANG, H., & LOVELL, C. R., Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.80, 2016. DOI:10.1128/mnbr.00037-15
- DIBAN, F. et al., Biofilms in Chronic Wound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock Chronic Wound Biofilm Model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 2, 2023. DOI:10.3390/ijms24021004

- EMEKA, P. M. et al., Inhibitory Potential of Mangiferin on Glucansucrase Producing *Streptococcus mutans* Biofilm in Dental Plaque. *Appl. Sci.*, v. 22, 2020. DOI:10.3390/app10228297
- FIDELIS, C. E. et al., Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. *Vet Sci.*, v. 4, 2024. DOI:10.3390/vetsci11040170
- FLEMMING, H. & WINGENDER, J., The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FLEMMING, H. & WUERTZ, S., Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 247–260. 2019. DOI:10.1038/s41579-019-0158-9
- FREITAS, R. et al., Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. *Foodborne Pathog Dis.*, v. 11, p. 951-955, 2013. DOI:10.1089/fpd.2013.1525
- FRIEDRICZEWSKI, A. B. et al., Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, 2018. DOI:10.22456/1679-9216.81813
- GEST H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond.*, v. 2, p. 187-201, 2004.
- GUADARRAMA, N. V. et al., Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 1, 2016. DOI:10.1016/j.ram.2016.08.006
- GUILHEN, C. et al., Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Molecular Microbiology*, v. 2, p. 188-2010, 2017. DOI:10.1111/mmi.13698
- HAMEED, Z. R. et al., Adaptability of Biofilm Formation in *Streptococcus Pneumoniae* to Various Growth Conditions. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, v. 15, p. 3594-3599, 2021. DOI:10.37506/ijfmt.v15i2.14931
- HOIBY, N. et al., Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS*, v. 125, p. 339-343, 2017. DOI:10.1111/apm.12689
- IDREES, M. et al., *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*, v. 44, 2021. DOI:10.3390/ijerph18147602

IÑIGUEZ-MORENO, M. et al., Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 2, 2018. DOI:10.1016/j.bjm.2017.08.002

KIRAN, F. et al., Microbial Biofilms in Veterinary Medicine. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, v. 1, 2022. DOI:10.33988/auvfd.1097786

da COSTA KREWER, C. C. et al., Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Springer Science*, v. 47, 2014. DOI:10.1007/s11250-014-0752-9

KVICH, L. et al., Do Mixed-Species Biofilms Dominate in Chronic Infections?—Need for in situ Visualization of Bacterial Organization. *Front Cell Infect Microbiol.*, v. 10, 2020. DOI:10.3389/fcimb.2020.00396

LAPPIN-SCOTT, H. et al. Revealing a world of biofilms - the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol.*, v. 11, p. 781-787, 2014. DOI:10.1038/nrmicro3343

LEDWOCH, K. et al., Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multicentre study. *Journal of Hospital Infection*, v. 100, p. 47-56, 2018. DOI:10.1016/j.jhin.2018.06.028

LEWANDOWSKI, Z. & BEYENAL. H., Fundamentals of Biofilm Research, second ed., CRC Press, 2017. ISBN: 978-1466559592.

LIU, X. et al. Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, v. 28, 2023. DOI:10.3390/molecules28062432

MELLO, P. L. et al., *Staphylococcus* spp. Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Regions of Brazil: Molecular Typing and Biofilm Gene Expression Analysis by RT-qPCR. *Antibiotics (Basel)*, v. 12, 2020. DOI:10.3390/antibiotics9120888

MERCHAND, S. et al., Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*, v. 2, p. 133-147, 2012. DOI:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x

MORITA, A. et al., Differences of *Streptococcus mutans* adhesion between artificial mouth systems: a dynamic and static methods. *Dental Journal*, v. 49, 2016. DOI:10.20473/j.djmk.v49.i2.p67-70

MUHAMMAD, M. H. et al. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*. v. 11, 2020. DOI:10.3389/fmicb.2020.00928

MUKHERJEE, S., BASSLER, BL Bacterial quorum sensing em ambientes complexos e em mudança dinâmica. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 17, p. 371–382, 2019. DOI:10.1038/s41579-019-0186-5

- NUNEZ, C. et al., A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. *Biofilm*, v. 5, 2023. DOI:10.1016/j.bioflm.2023.100105
- PAPADOPOULOU, V. et al., Overcoming biological barriers to improve treatment of a *Staphylococcus aureus* wound infection. *Cell Chemical Biology*, v. 30, p. 513–526, 2023. DOI:10.1016/j.chembiol.2023.04.009
- PARK, S. & SAUER, K., Controlling biofilm development through cyclic di-GMP signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 1386, p. 69-94, 2023. DOI:10.1007/978-3-031-08491-1_3
- PEDERSON, R. R. et al., Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontier in Vet. Science*, v. 8, 2021. DOI:10.3389/fvets.2021.656810
- PENG, Q. et al., A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*, v. 1, 2022. DOI:10.3390/antibiotics12010012
- PINTO, L. F. et al, The role of *Acanthamoeba* spp. in biofilm communities: a systematic review. *Parasitology Research*, v. 120, p. 2717-2729, 2021. DOI:10.1007/s00436-021-07240-6
- PROFT, T. & BAKER, E. N., Pili in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria—Structure, Assembly and their Role in Disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 4, p. 613-635, 2009. DOI: 10.1007/s00018-008-8477-4
- RAHEEL, I. et al., The Efficacy of Bacteriocins Against Biofilm-Producing Bacteria Causing Bovine Clinical Mastitis in Dairy Farms: A New Strategy. *Curr Microbiol.*, v. 7, 2023. DOI:10.1007/s00284-023-03324-x
- RALIM, R . M. A. et al., Detection of Biofilm Producing *Staphylococci* among Different Clinical Isolates and Its Relation to Methicillin Susceptibility. *Open Access Maced J Med Sci.*, v. 8, p. 1335-1341, 2018. DOI:10.3889/oamjms.2018.246
- RAOOF, W. M. et al., Detection of Biofilm Formation in some Pathogenic Bacteria Using Tube and Congo Red Agar Methods. *Rafidain Journal of Science*, v. 12, 2013. DOI:10.33899/rjs.2013.80268
- REZAEI, M. A. et al., Filament genes and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *Medical Microbiology*, v. 1, p. 17-25, 2020. DOI:10.1097/MRM.0000000000000195
- SAXENA, P. et al. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol.*, v. 59, p. 3-12, 2019. DOI:10.1007/s12088-018-0757-6
- SENTENAC, H. et al., The significance of biofilms to human, animal, plant and ecosystem health. *Functional Ecology*, v. 2, 2021. DOI:10.1111/1365-2435.13947

SFACIOTTE, R. A. P., et al., Formation of Biofilm by Staphylococcus Spp. in Bovine Mastitis Staphylococci Biofilm in Bovine Mastitis. *Dairy and Vet Sci J.*, v. 2, 2019. DOI:10.19080/JDVS.2019.10.555784

SHARMA et al., Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, v. 11, 2023. DOI:10.3390/microorganisms11061614

da SILVA, M. G. V. et al., *Enterococcus* spp. resistente a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho. *Medicina Veterinária*, v. 1, p. 5-31, 2024. DOI:10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/biologia/resistente-a-antimicrobianos

SUBRAMANI, R., JAYAPRAKASHVEL, M., Bacterial Quorum Sensing: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance. In book: Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, *Agriculture and Food Industry*, cap. 1, p. 21-37, 2019. DOI:10.1007/978-981-32-9409-7_3

TUON, F. F. et al., Antimicrobial Treatment of Staphylococcus aureus Biofilms. *Antibiotics (Basel)*, v. 1, 2023. DOI:10.3390/antibiotics12010087

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. & RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P., Biofilm Formation of Staphylococcus Aureus, *em: Staphylococcus Aureus*, Cap. 5, p. 87-103, 2018.

WACHTER, J. et al., Unravelling host-pathogen interactions by biofilm infected human wound models. *Biofilm*, v. 6, 2023. DOI:10.1016/j.biofilm.2023.100164

WANG, Y. et al., Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106, p. 6365-6381, 2022. DOI:10.1007/s00253-022-12150-3

WEBER, M. et al., Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and –independent methods. *Plos One*, v. 14, 2019. DOI:10.1371/journal.pone.0222238

WU, X. et al., Staphylococcus aureus biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics. *Biofilm*, v. 7, 2024. DOI:10.1016/j.biofilm.2023.100175

YI, L. et al., Advances in research on signal molecules regulating biofilms. *World J Microbiol Biotechnol.*, v. 35, 2019. DOI:10.1007/s11274-019-2706-x

ZHAO, X. et al., Biofilm Formation and Control of Foodborne. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. *RSC Advances*, v. 7, p. 36670–36683, 2023. DOI:10.1039/C7RA02497E

ZHENG, J. et al., Radezolid Is More Effective Than Linezolid Against Planktonic Cells and Inhibits Enterococcus faecalis Biofilm Formation. *Front Microbiol.*, v. 11, 2020.

ZHU, Y. et al., AHLs Regulate Biofilm Formation and Swimming Motility of *Hafnia alvei* H4.
Front. Microbiol., v. 10, 2019. DOI:10.3389/fmicb.2019.01330

CAPÍTULO II

PESQUISA (EM ARTIGO CIENTÍFICO)

Formação de biofilme e outros fatores patogênicos de *S. aureus* e demais bactérias Gram-positivas isoladas de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e comercializados no DF

¹OLIVEIRA, Y. S. G.; ²SILVA, SILVA, A. M.; ³PERECMANIS, S.

1. Yonara Silva Garcia de Oliveira, discente de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Saúde Animal (PPGSA), Universidade de Brasília (UnB)
2. Alice Martins da Silva, Me. e discente de Doutorado do PPGSA, UnB
3. Simone Perecmanis, Prof^o Dr^a UnB

Laboratório de Microbiologia Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal L4 Norte - Asa Norte, CEP: 70636-200, Brasília - DF, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: a presença de microrganismos patogênicos como o *Staphylococcus aureus* é responsável por ocasionar diversos prejuízos significativos na bovinocultura leiteira e na indústria de laticínios, devido a seus inúmeros fatores de virulência, como a formação de biofilme e resistência antimicrobiana. Biofilmes são agregados estruturados de microrganismos embebidos em uma matriz de polímeros extracelulares que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas. A formação de biofilme por bactérias é um importante fator de virulência e a sua produção está amplamente relacionada a presença de bactérias estafilocócicas e outras cocos Gram-positivas na indústria de laticínios e produção animal. A contaminação bacteriana em queijos tipo Minas frescal é facilitada por diversos fatores. Na produção artesanal utiliza-se leite cru, que sob práticas operacionais inadequadas de higiene de equipamentos das indústrias de laticínios e na presença de mastite bovina, pode conter ainda maior carga de microrganismos potencialmente patogênicos. O objetivo da pesquisa foi determinar a presença de *S. aureus* e outras bactérias cocos Gram-positivas em queijos Minas frescal produzidos de modo artesanal adquiridos na região do DF, identificar seus fatores de virulência como a capacidade de formação de biofilme *in vitro*, correlacionando com demais fatores de patogenicidade pesquisados, dentre eles a resistência a antimicrobianos. **METODOLOGIA:** foram analisadas 20 amostras de queijos Minas frescal do tipo artesanal e fracionado. A pesquisa envolveu cultura em ágar sangue e em meios seletivos; visualização por microscopia óptica; testes laboratoriais bioquímicos;

teste laboratorial de Coagulase em lâmina; teste de Difusão em Disco para antibiograma; análise de formação de biofilme pelos métodos de adesão em microplaca (com 24 e 48h) e ágar vermelho Congo (CRA); e técnicas moleculares de PCR para identificação de genes *nuc* e *blaZ*. **RESULTADOS:** de dez amostras foram isoladas onze cepas de bactérias cocos Gram-positivas: quatro *Staphylococcus* spp., quatro *S. aureus* (confirmados pela determinação do gene *nuc*), um *Enterococcus* spp. e dois *Streptococcus* spp. Dois *S. aureus* foram positivos para a presença do gene *blaZ* e dois foram considerados coagulase-positivos pelo teste fenotípico de Coagulase; dois *S. aureus* e um *Staphylococcus* spp. foram resistentes à penicilina G no teste de Difusão em Disco, assim como os dois *Streptococcus* spp. O *Enterococcus* spp. foi resistente a vários antibióticos, exceto aos beta-lactâmicos. A capacidade de formar biofilme pelo método CRA foi positiva para dois *S. aureus*, um *Staphylococcus* spp., o *Enterococcus* spp. e para os dois *Streptococcus* spp. Pelo método de adesão em microplaca em 24h, com exceção do *Enterococcus* spp. que apresentou como moderada, os demais apresentaram forte capacidade de produzirem biofilme; e com 48h, a capacidade diminuiu para alguns microrganismos. **DISCUSSÃO:** a presença do gene *nuc* é um marcador genético específico para a identificação de *Staphylococcus aureus*, auxiliando na confirmação de alguns desta espécie isolados dos queijos deste estudo; dois deles apresentaram o gene *blaZ* que está ligado à resistência a antibióticos beta-lactâmicos. A resistência à penicilina G foi observada fenotipicamente por alguns microrganismos e todos os estafilococos foram considerados como fortes na habilidade em formar biofilme. Apesar desta relação, o tamanho amostral foi pequeno para correlacionar fatores de virulência bacterianos encontrados, como a produção de biofilme, com a resistência antimicrobiana. Entretanto estudos recentes relatam tal associação e, com isso, dificuldades no tratamento de bovinos acometidos com mastite e a persistência e recorrência desta infecção, além de propiciar a contaminações de produtos lácteos levando a prejuízos das indústrias de laticínios, da produção animal e ao risco à segurança alimentar dos consumidores. **CONCLUSÃO:** o estudo forneceu base para a compreensão da habilidade de bactérias cocos Gram-positivas em produzir biofilmes, porém estudos *in vivo* e maior número de amostras, além de técnicas moleculares de avaliação de formação de biofilme e resistência antimicrobiana, seriam necessários para conclusão do grau de patogenicidade de microrganismos isolados de queijos Minas frescal artesanalmente produzidos e vendidos no DF. Esta pesquisa reflete a atenção que deve ser dada a melhores condições sanitárias em instalações de bovinocultura leiteira e de produção de laticínios, onde boas práticas de higiene de pequenos produtores e funcionários de fazendas e de comércios e feiras locais se fazem mais necessárias.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias Gram-positivas; *Staphylococcus aureus*; biofilme; fatores de virulência; resistência antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

No campo da indústria alimentícia de produtos de origem animal, especialmente dos laticínios, e na produção animal, a presença de microrganismos patogênicos como o *Staphylococcus aureus* é responsável por ocasionar diversos prejuízos significativos (PEDERSON et al., 2021). Este patógeno e outras bactérias estafilocócicas e, ainda, outras

Gram-positivas como *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. estão dentre os envolvidos em casos de mastite na bovinocultura de leite e em contaminações de produtos lácteos (ZHENG et al., 2020; SILVA et al., 2024; FIDELIS et al., 2024), devido a seus inúmeros fatores de virulência, como a formação de biofilme e resistência antimicrobiana (da COSTA KREWER et al., 2014; TUON et al., 2023).

Os biofilmes são agregados estruturados de microrganismos embebidos em uma matriz de polímeros extracelulares que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas (MUHAMMAD, et al., 2020; LIU et al., 2023). A formação de biofilme por bactérias é um importante fator de virulência, uma estratégia de sobrevivência no ambiente, que proporciona às bactérias resistência a vários fatores como à antibioticoterapia e à resposta imunológica do hospedeiro (da COSTA KREWER et al., 2014; RALIM et al., 2018; TUON et al., 2023). A formação de biofilmes por bactérias estafilocócicas e outras cocos Gram-positivas na indústria de laticínios e produção animal é amplamente significativa (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018; CARVALHO et al., 2021; OLIVA et al., 2021; FIDELIS et al., 2024). O *S. aureus* é frequentemente isolado de produtos lácteos e associado a casos de mastite bovina, causando infecções persistentes e recorrentes (MELLO et al., 2020; PEDERSON et al., 2021; RAHEEL et al., 2023; FIDELIS et al., 2024) e, assim como o *S. epidermidis*, outro agente causador de mastite bovina, são caracterizados por formarem biofilmes no úbere do animal, em equipamentos de ordenha e de processamento de leite, levando à infecção persistente dos animais da produção e deterioração dos laticínios, acarretando perdas econômicas consideráveis e comprometendo a segurança alimentar dos consumidores (MERCHAND et al., 2012; CARVALHO et al., 2021; MELLO et al., 2020; PEDERSON et al., 2021). O *Enterococcus* spp. também foi evidenciado como hábil em formar biofilme e possuir capacidade de resistência a antibióticos (ZHENG et al., 2020; SILVA et al., 2024). O *Streptococcus* spp. também é um importante agente causador de mastite em vacas leiteiras, com potencial de produzir biofilme, assim como os outros microrganismos, na glândula mamária, nos equipamentos de ordenha e nas superfícies de contato dos locais de processamento de laticínios (FIDELIS et al., 2024).

A mastite bovina é frequentemente causada por infecções bacterianas. O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes patogênicos envolvidos na mastite, causando tanto a forma clínica quanto subclínica da doença (PEDERSON et al., 2021; FIDELIS et al., 2024). O *S. aureus* frequentemente apresenta resistência a múltiplos antibióticos, incluindo meticilina (MRSA), o que torna o tratamento mais difícil e aumenta a necessidade de alternativas terapêuticas (ADWAN, 2014; TUON et al., 2014). A presença do gene *blaZ* em cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina evidencia que antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina e amoxicilina, podem ser ineficazes (da COSTA KREWER et al., 2014; FIDELIS et al., 2024). A complexidade da patogênese de *S. aureus* na mastite bovina, associada à sua habilidade de evadir o sistema imunológico, formar biofilme e desenvolver resistência a antibióticos representa um desafio significativo para a indústria de laticínios e à bovinocultura leiteira (PEDERSON et al., 2021).

Dentre os produtos lácteos, a contaminação bacteriana em queijos tipo Minas frescal é facilitada por fatores como o elevado teor de umidade, criando um ambiente favorável para o crescimento dos microrganismos; práticas inadequadas de higiene durante a produção e venda e armazenamento sem refrigeração adequada, podendo propiciar à contaminação e deterioração destes produtos (FREITAS et al., 2013; ALLAION et al., 2021). Na produção de queijos artesanal geralmente utiliza-se leite cru, permitido por regulamentação; mas que sob práticas

operacionais inadequadas pode levar a conter ainda maior carga de microrganismos potencialmente patogênicos como o *Staphylococcus aureus* (CARVALHO et al., 2021; PEDERSON et al., 2021).

O objetivo da pesquisa foi determinar a presença de *S. aureus* e demais bactérias cocos Gram-positivas em queijos Minas frescal produzidos de modo artesanal adquiridos na região do DF, identificar fatores de virulência como a capacidade de formação de biofilme *in vitro*, correlacionando com demais fatores de patogenicidade encontrados, dentre eles a resistência antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas para a pesquisa 20 amostras de queijos Minas frescal do tipo artesanal e fracionado (Q1 – Q20), adquiridos de comércios e feiras locais do DF durante o primeiro semestre de 2024. A análise microbiológica, cultura e testes laboratoriais bioquímicos e moleculares foram realizados no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade de Brasília. Os microrganismos foram cultivados por inoculação em placas de ágar sangue (AS) 5%, com auxílio de *swab* estéril, a partir do contato com a superfície de cada amostra; e incubadas a 37° C por 24 horas (KONEMAN et al., 2017). Colônias bacterianas obtidas foram analisadas quanto às características macroscópicas cor, textura, presença de odor, presença ou não de hemólise; sendo que das colônias com características mistas, foram realizados isolamentos individuais no mesmo meio ou em meios seletivos de identificação como o Chromagar® e o ágar Manitol salgado (MSA). Para seguimento da chave de identificação das bactérias também foram aplicados testes como catalase e O.F. (fermentação-oxidação), de acordo com Chauan & Dindal (2020); enquanto características microscópicas foram avaliadas por microscopia óptica pela técnica de coloração de Gram (KONEMAN et al., 2017). As bactérias Gram-positivas em formato de cocos foram isoladas e seguiram-se testes específicos:

Teste de Coagulase (ligada) - Coagulação em plasma de coelho em lâmina

Realizado nas cepas bacterianas de gênero *Staphylococcus* spp. para identificar fenotipicamente a presença da enzima coagulase, diferenciando-as em coagulase-positivas e coagulase-negativas. Utilizou-se plasma de coelho liofilizado, reconstituído com água destilada estéril conforme as instruções do fabricante (NewProv®). Uma pequena quantidade de cada colônia a ser avaliada foi suspensa em uma gota de solução salina estéril em uma lâmina de vidro limpa, criando uma suspensão homogênea. Uma gota de plasma de coelho foi adicionada à suspensão bacteriana na lâmina. Utilizando uma ponteira de pipeta estéril a suspensão foi misturada suavemente com o plasma. A lâmina foi levemente inclinada para observar se houve formação de grumos (aglutinação). Leitura dos Resultados: formação de grumos indicando resultado positivo; ausência de grumos indicando resultado negativo (KONEMAN et al., 2017)

Análise genotípica para identificar o gene *nuc*

Realizado para as bactérias de gênero *Staphylococcus* spp., visando determinar a espécie *S. aureus*. Se deu através da extração de DNA, reação em cadeia de polimerase (PCR) com amplificação do gene específico da nuclease (*nuc*) de *S. aureus* (KATEETE et al., 2010) e eletroforese em gel (CHAUHAN & JINDAL, 2020), utilizando-se, como controle positivo, a

cepa referência ATCC 29213. O DNA total das células bacterianas foi extraído usando o método de extração de DNA por fervura (ADWAN et al., 2014). O rendimento da extração calculado por espectrofotometria com base na absorvância (A) a 260 nm. A qualidade do DNA foi estimada usando a relação A260/A280. As reações em cadeia foram realizadas com o kit MasterMix Taq Pol 2x (Cellco®) de acordo com os ciclos e primers específicos de acordo com Kateete et al. (2010) (Tabela 1). Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio. A presença de uma banda correspondente ao tamanho esperado do gene *nuc* indicou resultado positivo. (CHAUHAN & JINDAL, 2020).

Análise genotípica da resistência a beta-lactâmicos (gene *blaZ*)

Foi avaliado nas bactérias *S. aureus* o gene *blaZ* para identificar resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Se deu através da extração de DNA, reação em cadeia de polimerase (PCR) e eletroforese em gel (CHAUHAN & JINDAL, 2020), utilizando-se, como controle positivo, a cepa referência ATCC 29213. O DNA total das células bacterianas foi extraído usando o método de extração de DNA por fervura (ADWAN, 2014). O rendimento da extração calculado por espectrofotometria com base na absorvância (A) a 260 nm. A qualidade do DNA foi estimada usando a relação A260/A280. As reações em cadeia foram realizadas com o kit MasterMix Taq Pol 2x (Cellco®) de acordo com os ciclos e primers específicos de acordo com Sawant et al. (2009) (Tabela 1). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (CHAUHAN & JINDAL, 2020) para confirmar a presença do gene *blaZ*.

Tabela 1. Primers – caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus*.

Gene	Fragmento (bp)	Sequência do Primer (5'-3')	Referência
<i>nuc</i>	279	F:GCGATTGATGGTGATACGGTT R:AGCCAAGCCTTGACGA ACTAAGC	Kateete et al., 2010
<i>blaZ</i>	517	R:GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG AAGAGATTTGCCTATGCTTC GCTTGACCACTTTTATCAGC	Sawant et al., 2009

Análise fenotípica de resistência antimicrobiana

Realizado em todas as bactérias cocos Gram-positivas isoladas, através do Teste de Difusão em Disco (método Kirby-Bauer) de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2020), envolvendo as etapas de preparação da suspensão bacteriana de acordo com o padrão de turbidez de 0,5 na escala de McFarland; inoculação em placas de ágar Mueller-Hinton (MH); aplicação dos discos de antimicrobianos; incubação das placas; e leitura dos resultados: sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado, de acordo com a tabela de referenciada pelo *CLSI* (2020). Sendo utilizados para o teste 12 tipos de discos antimicrobianos (Netlab®, Brasil): amoxicilina+ac. clavulânico 30 µg, cefoxitina 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, doxiciclina 30 µg, enrofloxacino 5 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10

μg, oxaciclina 5 μg, penicilina G 10 μg, rifampicina 5 μg, tetraciclina 30 μg e vancomicina 30 μg.

Técnicas de análise de formação de biofilme por métodos qualitativo e quantitativo, respectivamente:

Ágar vermelho Congo (CRA): análise fenotípica da produção de biofilme pelas bactérias isoladas, usando o ágar vermelho Congo (CRA), de acordo com o método descrito por **Freeman et al. (1989)**. As bactérias cultivadas foram inoculadas em CRA e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A formação de biofilme obtida pela observação da mudança de cor das cepas; sendo positiva quando formaram a coloração preta com aspecto seco/cristalino; e negativa quando permanecem vermelhas/rosadas.

Método de adesão em microplaca: método quantitativo por leitura de absorbância, detecta e quantifica a formação de biofilme em poços de microplacas. As colônias foram recultivadas em ágar sangue (AS) 5% e inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) até atingirem o padrão de turbidez de 0,5 McFarland. As culturas transferidas em duas placas estéreis de fundo reto com 96 poços (modelo 92096, TPP) em triplicatas, com um volume de 200 μL por poço. Em cada placa se obteve uma amostra de controle positivo (CI (USA) e uma de controle negativo (estéril). Uma das placas foi incubada em estufa por 24 horas e a outra por 48 horas, ambas a 37° sob condições aeróbicas. Após esse período, o conteúdo de cada poço foi aspirado com auxílio de pipeta multicanal e lavado com 200 μL de água destilada. As placas permaneceram 1 hora sob secagem no ambiente controlado por capela de fluxo. Em seguida, os poços foram fixados com metanol por 15 minutos e deixados sob secagem por mais uma hora. Posteriormente, os poços foram corados com solução de cristal violeta a 1% por 15 minutos. Os poços foram lavados novamente submetidos à secagem, e o biofilme suspenso novamente com ácido acético glacial a 33%. A leitura foi obtida por densidade óptica por espectrofotometria (Labsystems®, Multiskan EX®) usando filtro de 490 nm. Foi considerado como controle positivo neste método a cepa *S. aureus* CI (USA). A avaliação da formação de biofilmes foi classificada de acordo com Stepanovic et al. (2000) com algumas modificações. A média do controle negativo (ODc) foi usada para classificar os biofilmes, e os microrganismos (ODi) classificados como: não formadores: $ODi \leq ODc$; formação fraca: ($ODc < ODi \leq 2x ODc$); formação moderada: $2xODc < ODi \leq 4xODc$; e formação forte: $ODi \geq 4x ODc$ (STEPANOVIC et al., 2000; da COSTA KREWER et al., 2014).

RESULTADOS

Dos vinte queijos Minas frescal artesanal fracionado (Q1 – Q20), adquiridos para o estudo, foram identificadas em dez amostras, onze cepas bacterianas cocos Gram- positivas. Em uma amostra obteve-se dois isolados *S. aureus* (Q12.2) e outro *Staphylococcus* spp. (Q12.1); de cada uma das demais nove amostras, foi obtido uma cepa, das quais mais três foram identificadas como *S. aureus* (Q10, Q14 e Q17), três como *Staphylococcus* spp. (Q3, Q13 e Q19), duas como *Streptococcus* spp. (Q7 e Q8); e uma como *Enterococcus* spp (Q6).

Alguns resultados de testes laboratoriais fenotípicos de identificação (hemólise, fermentação em meio ágar Manitol salgado e O.F) seguem na tabela 2.

Microrganismo isolado	Hemólise em AS 5%	Fermentação em meio Manitol	O.F.
<i>Staphylococcus</i> spp. 1 (Q3)	ausente	não	fermentativo
<i>Staphylococcus</i> spp. 2 (Q12.1)	ausente	não	fermentativo
<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q13)	ausente	sim	fermentativo
<i>Staphylococcus</i> spp. 4 (Q19)	presente	sim	fermentativo
<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	ausente	sim	fermentativo
<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	ausente	sim	fermentativo
<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	presente	não	fermentativo
<i>S. aureus</i> 4 (Q17)	presente	não	fermentativo
<i>Enterococcus</i> spp. (Q6)	presente	-	fermentativo
<i>Streptococcus</i> spp. 1(Q7)	ausente	-	fermentativo
<i>Streptococcus</i> spp. 2 (Q8)	presente	-	fermentativo

O teste Coagulase em lâmina evidenciou dois microrganismos como coagulase-positivos (Q10 e Q12.2). O gene *nuc* foi evidenciado em quatro cepas bacterianas, sendo que em duas destas (Q14 e Q17) também foi demonstrado a presença do gene *blaZ*, como segue na tabela 3.

Tabela 3.

Genes	<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	<i>S. aureus</i> 4 (Q17)
<i>nuc</i>	+	+	+	+
<i>blaZ</i>			+	+

Os resultados do teste de resistência a antibióticos foram dispostos nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3:

Tabela 4.1 Resistência antimicrobiana por Teste de Difusão em Disco
sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R)

Antibiótico (disco)	<i>Staphylococcus</i> spp. 1 (Q3)	<i>Staphylococcus</i> spp. 2 (Q12.1)	<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q13)	<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q19)
Amoxicilina + ac. clavulânico	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	R	S
Ciprofloxacino	I	I	R	S
Doxiciclina	S	S	S	S
Enrofloxacino	I	I	R	S
Eritromicina	I	I	I	S
Gentamicina	S	S	S	S
Oxaciclina	S	S	S	S
Penicilina G	R	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S

Tabela 4.2. Resistência antimicrobiana por Teste de Difusão em Disco
sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R)

Antibiótico (disco)	<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	<i>S. aureus</i> 4 (Q17)
Amoxicilina + ac. clavulânico	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S	I
Ciprofloxacino	S	S	S	R
Doxiciclina	S	R	S	S
Enrofloxacino	I	I	I	S
Eritromicina	S	I	I	I
Gentamicina	S	S	S	S
Oxaciclina	S	I	S	S
Penicilina G	S	R	S	R
Rifampicina	S	S	S	S
Tetraciclina	S	R	S	I
Vancomicina	S	I	S	S

Tabela 4.3. Resistência antimicrobiana por Teste de Difusão em Disco
sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R)

Antibiótico (disco)	<i>Enterococcus</i> spp. (Q6)	<i>Streptococcus</i> spp. 1 (Q7)	<i>Streptococcus</i> spp. 2 (Q8)
Amoxicilina + ac. clavulânico	S	S	S
Cefoxitina	R	S	R
Ciprofloxacino	R	R	R
Doxiciclina	R	R	R
Enrofloxacino	R	R	R
Eritromicina	R	R	R
Gentamicina	R	R	R
Oxaciclina	S	I	S
Penicilina G	S	R	R
Rifampicina	R	R	R
Tetraciclina	R	R	R
Vancomicina	R	R	R

Os resultados da leitura de absorvância de formação de biofilme por método de adesão em microplaca seguem nas tabelas 5.1 e 5.2 (adesão em 24 horas de incubação da microplaca); e 6.1 e 6.2 (adesão em 48 horas).

Tabela 5.1
Formação de biofilme por adesão em microplaca
em 24 horas – Leitura de Absorvância

Controle negativo (ODc)	Unidades de densidade óptica (OD)
Média da triplicata ODc	0,046
2x ODc	0,092
4x ODc	0,184

Tabela 5.2 Formação de biofilme por adesão em microplaca **em 24 horas**

Amostra (ODi)	<i>Staphylococcus</i> spp. 1 (Q3)	<i>Staphylococcus</i> spp. 2 (Q12.1)	<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q13)	<i>Staphylococcus</i> spp. 4 (Q19)
Média triplicata de ODi	0,518	0,549	0,558	0,631
Resultado	Forte	Forte	Forte	Forte
Amostra (ODi)	<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	<i>S. aureus</i> 4 (Q17)
Média triplicata de ODi	0,660	0,345	0,457	0,604
Resultado	Forte	Forte	Forte	Forte
Amostra (ODi)	<i>Streptococcus</i> spp. 1(Q7)	<i>Streptococcus</i> spp. 2 (Q8)	<i>Enterococcus</i> spp. (Q6)	Controle positivo (CI (USA))
Média triplicata de ODi	0,346	0,237	0,102	0,331
Resultado	Forte	Forte	Moderado	Forte

Tabela 6.1
Formação de biofilme por adesão em microplaca
em 48 horas – Leitura de Absorbância

Controle negativo (ODc)	Unidades de densidade óptica (OD)
Média da triplicata ODc	0,249
2x ODc	0,498
4x ODc	0,996

Tabela 6.2 Formação de biofilme por adesão em microplaca **em 48 horas**

Amostra (ODi)	<i>Staphylococcus</i> spp. 1 (Q3)	<i>Staphylococcus</i> spp. 2 (Q12.1)	<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q13)	<i>Staphylococcus</i> spp. 4 (Q19)
Média triplicata de ODi	1,017	0,988	0,959	0,490
Resultado	Forte	Moderado	Moderado	Moderado
Amostra (ODi)	<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	<i>S. aureus</i> 4 (Q17)
Média triplicata de ODi	1,571	1,233	0,968	1,010
Resultado	Forte	Forte	Moderado	Forte
Amostra (ODi)	<i>Streptococcus</i> spp. 1 (Q7)	<i>Streptococcus</i> spp. 2 (Q8)	<i>Enterococcus</i> spp. (Q6)	Controle positivo (CI (USA))
Média triplicata de ODi	0,759	0,649	0,498	1,168
Resultado	Moderado	Forte	Fraco	Forte

Os resultados da formação de biofilme pelo método CRA (ágar vermelho Congo) seguem na tabela 7:

Tabela 7 Formação de biofilme por cultura bacteriana em meio **ágar vermelho Congo**

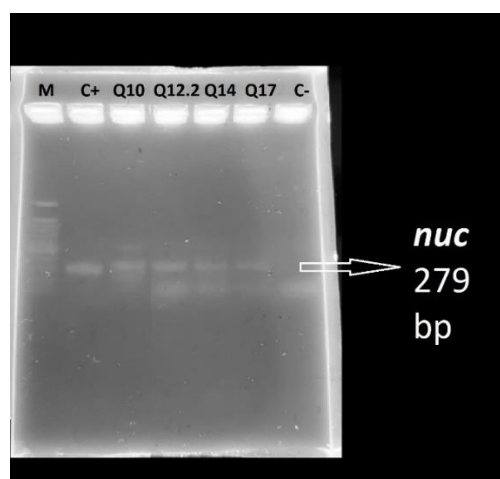
Microrganismo isolado	Capacidade de formar biofilme
<i>Staphylococcus</i> spp. 1 (Q3)	Não formador
<i>Staphylococcus</i> spp. 2 (Q12.1)	Não formador
<i>Staphylococcus</i> spp. 3 (Q13)	Formador
<i>Staphylococcus</i> spp. 4 (Q19)	Não formador
<i>S. aureus</i> 1 (Q10)	Formador
<i>S. aureus</i> 2 (Q12.2)	Formador
<i>S. aureus</i> 3 (Q14)	Não formador
<i>S. aureus</i> 4 (Q17)	Não formador
<i>Enterococcus</i> spp. (Q6)	Formador
<i>Streptococcus</i> spp. 1(Q7)	Formador
<i>Streptococcus</i> spp. 2 (Q8)	Formador

DISCUSSÃO

A produção de hemólise por bactérias está associada a fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade em infecções humanas e animais. As colônias de *S. aureus* em meio AS frequentemente apresentam hemólise ao seu redor. Essa característica é advinda particularmente da beta-hemólise e é devido à produção de hemolisinas como a alfa-toxina, que forma poros na membrana das hemáceas, levando à lise (VANDENESCH et al, 2012; MURRAY et al, 2016). Dos quatro *S. aureus* isolados, dois apresentaram hemólise fenotipicamente, ao se observar um halo claro ao redor das colônias. Apesar de ser o principal estafilococo conhecido por produzir beta-hemólise, nem todo *S. aureus* apresenta essa capacidade (COLACITE et al, 2011, KONEMAN et al., 2017). Dos quatro isolados de *Staphylococcus* spp a hemólise foi identificada, de forma fenotípica, em um deles. Não tão frequente, outros estafilococos como o *S. haemolyticus*, podem produzir beta-hemólise e está relacionado a infecções hospitalares, mas já foi identificado como contaminante em indústrias de laticínios (SCHNITT et al., 2021). *Enterococcus* spp. como *E. faecalis* e *E. faecium* também podem causar hemólise (MURRAY et al, 2016; GARCÍA-SOLACHE & RICE, 2019), como apresentado por este isolado, assim como por uma das duas cepas de *Streptococcus* spp. isoladas, outro gênero bacteriano relacionado à produção de hemólise (MURRAY et al, 2016; LAUPLAND et al., 2019).

A presença do gene *nuc* é um marcador genético específico para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O gene *nuc* codifica a nuclease termotável, uma enzima produzida por essa espécie. A enzima nuclease degrada o DNA em condições de alta temperatura, característica distintiva que auxilia na diferenciação de *S. aureus* de outros estafilococos (MAES et al., 2002; GHADERI et al, 2020). Seu método molecular de identificação realizado determinou a presença de quatro cepas dessa espécie de um total de oito estafilococos encontrados, como segue na figura 1.

Figura 1. Interpretação do resultado de PCR após eletroforese em gel de agarose para o gene *nuc*. Linha M (marcador amplificador molecular - MasterMix Taq Pol 2x da Cellco®), Linha C+ (controle positivo), linhas Q10, Q12.2, Q14 e Q17 (microrganismos) e C- (controle negativo); pb (pares de base).



No *S. aureus* a enzima coagulase é considerada também uma proteína relacionada à especificidade (BROWN, et al., 2005; MURRAY et al., 2016). O teste de Coagulase, fenotípico,

evidenciou aglutinação de duas cepas bacterianas dos quatro *S. aureus* isolados, determinando somente estes dois como coagulase-positivos. Entretanto, o teste Coagulase em lâmina só detecta a forma ligada da enzima, podendo ser necessário realizar o teste em tubo para detectar a coagulase livre (MURRAY et al., 2016). Falsos negativos podem ocorrer nos testes fenotípicos se a amostra bacteriana não estiver nas melhores condições (MARTINEZ et al., 2001). Locatelli et al. (2021) também identificou fenotipicamente cepa de *S. aureus* como coagulase-negativo. O método ideal de identificação da proteína de virulência coagulase é a determinação do gene *coaA* por técnica molecular de PCR, que codifica esta enzima, confirmando sua presença (LOCATELLI et al., 2021). Entretanto, apesar de rara, a literatura reconhece existência genotípica de *S. aureus* coagulase-negativa, isolada de leite mastítico (AKINEDEN et al., 2011). Estas cepas ainda podem ser patogênicas e a ausência de coagulase pode dificultar sua identificação usando métodos tradicionais (LOCATELLI et al., 2023). A **figura 2** demonstra coagulação do plasma em lâmina na presença de amostra de *S.aureus* pelo teste fenotípico de Coagulase.



Figura 2

O gene *blaZ* é responsável pela produção da enzima beta-lactamase em bactérias como o *Staphylococcus aureus* e confere resistência a penicilinas e outros antibióticos beta-lactâmicos. A presença deste gene tem implicações clínicas significativas na mastite bovina, dificultando o tratamento e controle da infecção e propiciando à contaminação de laticínios (da COSTA KREWER et al., 2014; FIDELIS et al., 2024). Este gene codifica a enzima beta-lactamase, que é capaz de hidrolisar o anel beta-lactâmico presente nas penicilinas, inativando-as, por romper a ligação amida no anel beta-lactâmico, convertendo a penicilina em ácido peniciloico inativo (BUSH, 2011). O gene foi testado, pelo método genotípico através de PCR, nos quatro *S. aureus* isolados, sendo que dois deles o apresentaram apenas um destes dois, pelo teste fenotípico de Difusão em Disco que avaliou a resistência a vários antibióticos, evidenciou ser resistente à penicilina G. Em contrapartida, os demais dois *S. aureus* com ausência genotípica de *blaZ* testado, apresentaram resistência ao disco de penicilina G.

Dentre os *Staphylococcus* spp., apenas um demonstrou ser resistente à penicilina G pelo teste fenotípico de Difusão em Disco. Os *Streptococcus* spp. também foram resistentes à esse antimicrobiano. Estes e o *Enterococcus* spp. isolados evidenciaram resistência a diversas outras classes de antibióticos testados, corroborando com os estudos de da SILVA et al. (2024) em uma pesquisa de *Enterococcus* spp isolados de amostras de queijo; e de Tomazi et al. (2018) e Tomazi et al. (2019), os quais demonstram que bactérias do gênero *Streptococcus* spp, como *S. uberis* e *S. agalactiae* são frequentemente isolados de casos de mastite bovina e de laticínios e possuem alta capacidade de resistência antimicrobiana. A resistência aos antibióticos pode levar a infecções mais persistentes e difíceis de erradicar, aumentando a duração e a severidade da mastite, o que contribui para perdas econômicas significativas devido à redução na produção

de leite, descarte de leite contaminado e aumento dos custos de tratamento (da COSTA KREWER et al., 2014; do NASCIMENTO et al., 2023; FIDELIS et al., 2024).

Os métodos laboratoriais de avaliação de formação de biofilme mais comumente utilizados de acordo com estudos recentes são o CRA (ágar vermelho Congo) e, ainda, de forma quantitativa, a adesão em microplaca (MARQUES et al., 2016; HALIM et al., 2018; CRUZADO-BRAVO et al., 2019; CARVALHO et al., 2021; FIDELIS et al.,

2024). Esta pesquisa evidenciou que, pelo método CRA, metade dos *S. aureus* e um *Staphylococcus* spp. foram considerados formadores de biofilme, apresentando as características da figura 3a. Os demais estafilococos não apresentaram alteração de cor após seu crescimento no meio CRA (figura 3b). Os *Streptococcus* spp. e o *Enterococcus* spp. do estudo foram todos considerados produtores de biofilme por este método. No CRA, a avaliação, qualitativa, é considerado um método de pouca sensibilidade (MELO et al., 2013; HALIM et al., 2018; PEDERSON et al., 2020). Além disso, diferenças no tom de enegrecimento e na textura da colônia no CRA podem ser consideradas como variados graus de formação de biofilme (ATSHAN et al., 2012).

Figura 3a. Cor preta da colônia com aspecto seco e cristalino (formação de biofilme).

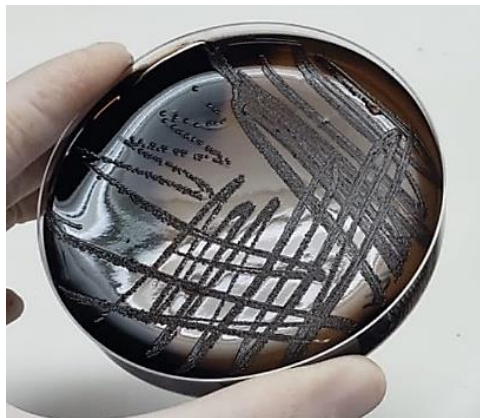
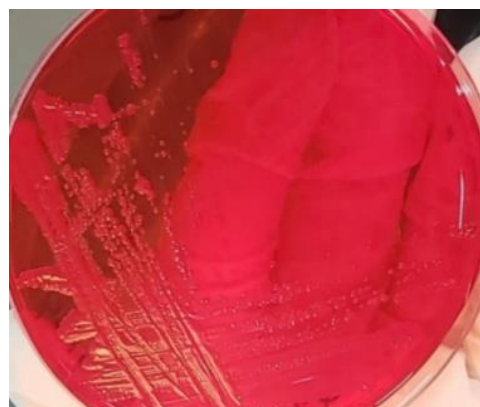


Figura 3b. Não houve mudança fenotípica no CRA após cultivo da cepa bacteriana.



No método de adesão em microplaca, a formação de biofilme avaliada com 24 horas de incubação da microplaca, demonstrou que todos os microrganismos isolados dos queijos evidenciaram capacidade de formação de biofilme e, com exceção do *Enterococcus*, que evidenciou moderada, os demais apresentaram forte habilidade desta patogenicidade. Com 48 horas de incubação, observou-se mudança na leitura de absorvância dos biofilmes,

evidenciando a redução da capacidade de sua formação por alguns microrganismos. Um dos *S. aureus* passou de forte para moderado formador, três dos quatro *Staphylococcus* spp. de forte para moderada formação, um *Streptococcus* spp. de forte para moderada e o *Enterococcus* spp. que, de moderado, passou para fraco formador de biofilme. Essa redução de adesão de biofilme em microplacas com período de 48h de incubação, corrobora com os achados de Carvalho et al. (2021), ao avaliar a produção de biofilme *in vitro* em *S. aureus* isolados de embalagens de queijo Minas frescal em 24, 48 e 72h de incubação da microplaca, relacionando tal fato à fase de adesão reversível dos biofilmes. Este mesmo estudo concluiu que com 72h de incubação da microplaca, a formação de biofilme foi maior do que com as 24h iniciais. De todo modo, considera-se como método de escolha para avaliar a produção *in vitro* de biofilmes o período de 24h de incubação da microplaca, como padronizado por Stepanovic et al., (2000) e seguido por pesquisas de referência (da COSTA KREWER et al., 2014; CRUZADO-BRAVO et al., 2019; FIDELIS et al., 2024), entretanto mais estudos com diferentes períodos para avaliar intensidade de adesão de biofilmes *in vitro* seriam interessantes.

Houve relação entre a resistência antimicrobiana à penicilina G e o método quantitativo de formação de biofilme (adesão em placa) em duas cepas de *S. aureus*, onde ambas demonstraram forte capacidade na produção de biofilme tanto no período de 24h, quanto de 48h de análise. No geral, não foi possível obter correlação entre a resistência antimicrobiana com a capacidade de formação de biofilmes pelas bactérias do estudo. Fidelis et al. (2014), avaliou a habilidade de produção de biofilme com o método de adesão em microplaca de um elevado número de *S. aureus* e *S. uberis* isolados de leite mastítico, correlacionando com resistência a antibióticos por teste de Difusão em Disco e não concluiu uma associação, apesar de terem evidenciado resistência significativa a penicilinas. Em contrapartida, diversos estudos que utilizaram os mesmos métodos encontraram correlação entre esses fatores de patogenicidade (da COSTA KREWER et al., 2014; MARQUES et al., 2016; PEDERSON et al., 2021), sugerindo que isolados com alta habilidade de produção de biofilme tendem a ser mais resistentes a terapias antimicrobianas. Entretanto, mesmo o método de adesão em microplaca se demonstrar vantajoso em relação ao ágar vermelho Congo (MELO et al., 2013; HALIM et al., 2018), técnicas moleculares são primordiais para determinar esta relação de forma mais precisa (MELO et al., 2013; RUZADO-BRAVO et al., 2019; MELLO et al., 2020). Carvalho et al. (2021) pesquisou a formação de biofilme por *S. aureus* pelo método de adesão em microplaca e por visualização em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e evidenciou que uma proporção significativa de isolados foi capaz de formar biofilmes em diferentes intensidades, indicando a presença de genes relacionados à biofilme. Métodos avançados de biologia molecular para avaliar a produção de biofilme por microrganismos já são alvos de atuais pesquisas, como a PCR em Tempo Real Quantitativa (RT-qPCR) através da expressão de genes do operon *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*), responsáveis pela produção de polissacarídeos no biofilme (CRUZADO-BRAVO et al., 2019; MELLO et al., 2020).

CONCLUSÕES

Este estudo forneceu base para a compreensão da habilidade de bactérias cocos Gram-positivas produzirem biofilme, estudos *in vivo* e com maior número de amostras seriam apropriados para avaliar o real grau de tal patogenicidade dos diferentes microrganismos envolvidos na patogênese de mastites bovinas que apresentem resistência a antimicrobianos; e nas contaminações e deterioração de produtos lácteos.

Inúmeros são os fatores de virulência que caracterizam um microrganismo patogênico como o *S. aureus*, sendo que dentro da mesma espécie há variações nesse contexto. Além de testes laboratoriais fenotípicos, testes moleculares que avaliem presença de genes específicos para determinar fatores de patogenicidade são importantes para melhor conclusão da análise microbiológica.

Também, é preciso atenção especial as condições sanitárias em instalações de bovinocultura leiteira e de produção de laticínios na região, onde boas práticas de higiene e de manejo são necessárias; sinalizando um alerta a órgãos fiscalizadores e aos consumidores locais.

REFERÊNCIAS

ALLAION, J. R. et al., Assessing the Microbiological Safety Parameters of Minas Artisanal Cheese Samples in Retail Environments in São Paulo, Brazil. *Appl. Sci.*, v. 11, 2021. DOI:10.3390/app11199331

ATSHAN, S. S., NOR SHAMSUDIN, M., SEKAWI, Z., et al., Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012. DOI: 10.1155/2012/976972

ADWAN, K et al., Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia Microbiol*, v. 59, p. 5–8, 2014. DOI:10.1007/s12223-013-0259-1

AKINEDEN, O., ABDULWAHED, A., HASSAN, A., SCHNEIDER, E., A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. *Journal of Dairy Research*, v. 1, p. 38-42, 2011. DOI:10.1017/S0022029910000774

BROWN, D. F. J. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, v. 6, p; 1000-1018, 2005. DOI:10.1093/jac/dki372

BUSH, K., Evolution of β -Lactamases: Past, Present, and Future. *Antibiotic Discovery and Development*, p. 427–453, 2011. DOI:10.1007/978-1-4614-1400-1_12

CARVALHO, L. G. et al., *Staphylococcus aureus* biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging. *International Journal of Dairy Technology*, v. 3, 2021. DOI:10.1111/1471-0307.12783

CHAUHAN, A. & JINDAL, T. Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification. No livro: *Microbiological Methods for Environment. Food and Pharmaceutical Analysis*, cap. 1, p. 425–468, 2020.

COLACITE, J. et al., Pathogenic potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various origins. *Annals of Microbiology*, v. 61, p. 639-647, 2011. DOI:10.1007/s13213-010-0184-3

da COSTA KREWER, C. C. et al., Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Springer Science*, v. 47, 2014. DOI:10.1007/s11250-014-0752-9

CRUZADO-BRAVO, M. L. M. et al., Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. *Food Research International*, v. 122, p. 450-460, 2019. DOI:10.1016/j.foodres.2019.04.017

FIDELIS, C. E. et al., Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. *Vet Sci.*, v. 4, 2024. DOI:10.3390/vetsci11040170

FREEMAN, D. J. FALKINER, F. R., KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.*, v. 8, P. 872-874, 1989. DOI:10.1136/jcp.42.8.872

FREITAS, R. et al., Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. *Foodborne Pathog Dis.*, v. 11, p. 951-955, 2013. DOI:10.1089/fpd.2013.1525

FRIEDRICZEWSKI, A. B. et al., Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, 2018. DOI:10.22456/1679-9216.81813

GARCÍA-SOLACHE, M. & RICE, L. B., The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, 2019. DOI:10.1128/cmr.00058-18

GHADERI, H. et al., Evaluation of Genotypic and Phenotypic Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples and Their Association with Antimicrobial Resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, v. 5, p. 441-459, 2020. DOI:10.30699/ijmm.14.5.441

HALIM, R. M. A. et al.,. Detection of Biofilm Producing Staphylococci among Different Clinical Isolates and Relation to Methicillin Susceptibility. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. v. 8, p. 1335-1341, 2018. DOI:10.3889/oamjms.2018.246

KATEETE, D.P., KIMANI, C.N., KATABAZI, F.A. et. al., Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 9, 2010. DOI:10.1186/1476-0711-9-23

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., & WINN, W. C. Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

- LAUPLAND, K. B. et al., Bloodstream infection due to β -hemolytic streptococci: a population-based comparative analysis. *Infection*, v. 47, p. 1021–1025, 2019. DOI:10.1007/s15010-019-01356-9
- LIU, X. et al. Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, v. 28, 2023. DOI:10.3390/molecules28062432
- LOCATELLI, C. et al., Staphylococcus aureus coa gene sequence analysis can prevent misidentification of coagulase-negative strains and contribute to their control in dairy cow herds. *Front. Microbiol.*, v. 14, 2023. DOI:10.3389/fmicb.2023.1120305
- MAES, N, et al., Evaluation of a Triplex PCR Assay To Discriminate Staphylococcus aureus from Coagulase-Negative Staphylococci and Determine Methicillin Resistance. *Clinical Microbiology*, v. 4, p. 1514-1517, 2002. DOI:10.1128/JCM.40.4.1514-1517.2002
- MARQUES F. V. et al., Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 118-124, 2016. DOI:10.1016/j.bjm.2016.10.001
- MARTINEZ C. N. et al., Caracterização de Staphylococcus sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 1, 2001.
- MELO, P. et al., Comparison of methods for detection of biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 44, 2013. DOI:10.3390/antibiotics9120888.
- MELLO, P. L. et al., Staphylococcus spp. Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Regions of Brazil: Molecular Typing and Biofilm Gene Expression Analysis by RT-qPCR. *Antibiotics (Basel)*, v. 12, 2020. DOI:10.1590/S1517-83822013005000031
- MERCHAND, S. et al., Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*, v. 2, p. 133-147, 2012. DOI:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.
- MUHAMMAD, M. H. et al. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*. v. 11, 2020. DOI:10.3389/fmicb.2020.00928
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., & PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*. 8th ed. Elsevier Health Sciences, 2016.
- SCHNITT, A. et al, The occurrence of methicillin-resistant non-aureus staphylococci in samples from cows, young stock, and the environment on German dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 104, p. 4604-4614, 2021. DOI:10.3168/jds.2020-19704
- OLIVA, A. et al., Biofilm-Related Infections in Gram-Positive Bacteria and the Potential Role of the Long-Acting Agent Dalbavancin. *Front Microbiol.*, v. 12, 2021. DOI:10.3389/fmicb.2021.749685

PEDERSON, R. R. et al., Biofilm Research in Bovine Mastitis. *Frontiers in Vet. Science*, v. 8, 2021. DOI:10.3389/fvets.2021.656810

RAHEEL, I. et al., The Efficacy of Bacteriocins Against Biofilm-Producing Bacteria Causing Bovine Clinical Mastitis in Dairy Farms: A New Strategy. *Curr Microbiol.*, v. 7, 2023. DOI:10.1007/s00284-023-03324-x

RALIM, R. M. A. et al., Detection of Biofilm Producing Staphylococci among Different Clinical Isolates and Its Relation to Methicillin Susceptibility. *Open Access Maced J Med Sci.*, v. 8, p. 1335-1341, 2018. DOI:10.3889/oamjms.2018.246

SAWANT, A. A., GILLESPIE, N. E., OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol*, v. 1-2, p. 73-81, 2009. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.09.006

da SILVA, M. G. V. et al., *Enterococcus* spp. resistente a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho. *Medicina Veterinária*, v. 1, p. 5-31, 2024. DOI:10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/biologia/resistente-a-antimicrobianos

STEPANOVIC, S. et al., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, v. 2, p. 175-179, 2000. DOI:10.1016/s0167-7012(00)00122-6

TOMAZI, T., Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of Streptococcus agalactiae isolated from clinical mastitis in dairy cattle. *PloS One*, v. 6, 2018. DOI:10.1371/journal.pone.0199561

TOMAZI, T. et al., Genotyping and antimicrobial resistance of Streptococcus uberis isolated from bovine clinical mastitis. *PLoS One*, v. 10, 2019. DOI:10.1371/journal.pone.0223719

TUON, F. F. et al., Antimicrobial Treatment of Staphylococcus aureus Biofilms. *Antibiotics (Basel)*, v. 1, 2023. DOI:10.3390/antibiotics12010087

VANDENESCH, F., LINA, G., HENRY, T., Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, 2012. DOI:10.3389/fcimb.2012.00012

ZHENG, J. et al., Radezolid Is More Effective Than Linezolid Against Planktonic Cells and Inhibits Enterococcus faecalis Biofilm Formation. *Front Microbiol.*, v. 11, 2020. DOI:10.3389/fmicb.2020.00196