**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios
produtores de queijo Minas frescal**

José Guilherme Prado Martin

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Piracicaba
2015**

José Guilherme Prado Martin
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios
produtores de queijo Minas frescal**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Martin, José Guilherme Prado

Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal / José Guilherme Prado Martin. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
102 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biofilme 2. *Staphylococcus aureus* 3. Laticínio 4. Minas frescal I. Título

CDD 614.31
M381b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

[Smile, though your heart is aching
Smile, even though it's breaking
When there are clouds in the sky
You'll get by...
If you smile
With your fear and sorrow
Smile and maybe tomorrow
You'll see the sun come shining through, for you

Smile, Charles Chaplin]

À querida amiga
Evanilda Terezinha Perissinoto Próspero (*in memoriam*),

Ao querido Ernani Porto (*in memoriam*),
por todas as oportunidades e ensinamentos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Ernani Porto (*in memoriam*), pela oportunidade de crescimento acadêmico ao longo de todos esses anos, bem como pela troca de experiências, reflexões, senso crítico, tão importantes quanto as questões científicas inerentes à prática profissional.

À professora Marta Helena Fillet Spoto e à Evanilda Teresinha Perissinoto Prospero (*in memoriam*), por me oferecerem condições plenas de desenvolver este projeto, mesmo envolvido em outras atividades profissionais.

Ao professor Dr. Francisco André Ossamu Tanaka e ao Especialista Renato Barbosa Salaroli, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica (LFN/ESALQ), pela solicitude.

À técnica do Laboratório de Higiene e Laticínios, Denise de Almeida Leme Baptista, pelo apoio e carinho ao longo desses anos.

Aos colegas de laboratório Amanda Marabesi, Bruno Galli, Carolina Pamplona, Fabiane Furlan, Gabriela Oliveira e Silva, Giovana Barancelli, Laís Zerbeto, Marjory Xavier, Melina Cruzado, Natália Cirone.

Ao colega de laboratório e parceiro de trabalho Caio Morales, pela grande e valiosa ajuda em todo o decorrer do experimento.

À colega Carolina Rodrigues Fonseca, pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Ao colega Daniel Miquelutti, pelo auxílio na análise estatística.

Aos secretários da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fábio Benedito Rodrigues e Ana Paula Meneghetti, pela disposição e solicitude.

À Capes, pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido (Processo FAPESP 2011/07192-7).

A todos que, direta ou indiretamente, foram responsáveis pela realização desse projeto.

SER MICROBIOLOGISTA

Ser microbiologista é ver o invisível
semear e multiplicar vida
em universos fechados, restritos e infinitos
para célula minúscula, que, ainda imóvel,
em vida todo seu horizonte não percorre

É ver o que ninguém vê,
ver hoje o que amanhã nascerá,
favorecer uns em detrimento de outros
nos meios seletivos
Pôr vida em mundos estéreis
manipular e decidir o destino de milhões, bilhões de seres

Ser senhor do tempo e da razão
da chave da autoclave
armagedon da criação.
Em seu mundo, suas vidas, sem piedade
decretamos a extinção.

Não sabem as bactérias
que as usamos para uma simples reação.
Elas fornecem as respostas
Não a damos nós, senhores da criação

Tendo isto obtido, então,
não separamos inócuo de patogênico
o bom do mau
o certo do errado
o pio do descrente.
Não somos justos ou injustos.
Não julgamos:
esterilizamos!

Ernani Porto

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2 Leite e derivados como veículos de <i>S. aureus</i>	27
2.3 Biofilmes bacterianos	31
2.4 Biofilmes em laticínios	37
2.5 Expressão gênica de biofilmes em <i>S. aureus</i>	43
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Caracterização do universo amostral	51
4.2 Caracterização das cepas analisadas	51
4.3 Reativação das culturas	52
4.4 Extração de DNA genômico (Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”)	52
4.5 Detecção de genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> envolvidos na síntese de biofilmes	53
4.6 Ensaios de biofilmes	54
4.6.1 Preparo do inóculo	54
4.6.2 Preparo dos cupons	54
4.6.3 Estudo da adesão bacteriana	55
4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
4.7 Avaliação da eficiência do processo de limpeza e sanificação sobre as células aderidas	58
4.8 Análise estatística	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Amplificação de fragmentos de gene produtores de biofilmes	61
5.2 Ensaios de biofilmes	67
6 CONCLUSÕES	91

REFERÊNCIAS93

RESUMO

Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal

Biofilmes de estafilococos têm se tornado uma das grandes preocupações da indústria de lácteos, principalmente em decorrência do ritmo de produção intenso, automação das plantas de processamento e exigência cada vez maior quanto à qualidade microbiológica de leite e derivados. O presente estudo teve por objetivo identificar cepas de *S. aureus* potencialmente produtoras de biofilmes isoladas de 3 laticínios produtores de queijo Minas frescal, avaliar a influência da temperatura e da superfície de contato (aço inoxidável e polipropileno) no processo de adesão bacteriana, bem como a eficácia de um protocolo simulado de limpeza e sanitização na remoção das células aderidas. Para as análises genotípicas pesquisaram-se os genes *icaA* e *icaD* nos isolados, relacionados à produção de polissacarídeos de adesão celular e exopolissacarídeos da matriz de biofilmes. Os ensaios de biofilmes foram realizados em cupons incubados em um reator de biofilmes, comparando-se a adesão frente a duas temperaturas (5°C e 35°C), duas superfícies (aço inoxidável e polipropileno) e quatro tempos de contato (3, 6, 12 horas e após processo de limpeza e sanitização). Para avaliação da eficácia do processo na remoção das células aderidas, foram utilizados detergente neutro (3,5% v/v) e sanificante à base de hipoclorito de sódio (1000 mg.L⁻¹), de modo a simular a situação observada em um dos laticínios estudados. Foi detectada a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 74% e 77% dos isolados, respectivamente; 70% dos isolados apresentaram ambos os genes, enquanto 19% não apresentaram nenhum. O número de células aderidas em ambas as superfícies foi em torno de 3 e 6 log₁₀ UFC.cm⁻² nas temperaturas de 5°C e 35°C, respectivamente, para a maioria das situações avaliadas, com aumento significativo no decorrer dos períodos avaliados. De maneira geral, a temperatura de 35°C favoreceu uma maior adesão de *S. aureus*. A 5°C, houve considerável número de células aderidas, mas em populações significativamente inferiores às observadas a 35°C. O protocolo de limpeza e sanitização mostrou-se ineficaz na remoção das células aderidas; uma melhor atuação do hipoclorito de sódio foi observada a 5°C, o que deve estar relacionado à menor adesão observada nessa temperatura. De qualquer forma, o processo não foi capaz de reduzir a níveis seguros a quantidade de *S. aureus* aderida a ambas as superfícies, nas condições avaliadas. O estudo demonstrou a capacidade de adesão de *S. aureus* isolados de laticínios em superfícies comumente encontradas na produção de queijo Minas frescal, situação que pode favorecer o desenvolvimento de biofilmes em equipamentos e utensílios, conferindo risco à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Biofilme; *Staphylococcus aureus*; *ica*; Laticínio; Minas frescal

ABSTRACT

Biofilms of *Staphylococcus aureus* isolated from dairies producers of Minas frescal cheese

Staphylococci biofilms have become a major concern for the dairy industry, mainly due to the intensive production flow, automation of processing plants and increased demand on the microbiological quality of dairy products. This study aims to identify isolated *S. aureus* strains potentially producers of biofilms from 3 dairies of Minas fresh cheese, evaluate the influence of temperature and the contact surface (stainless steel and polypropylene) in the bacterial adhesion process, as well as the efficacy of an hygiene and sanitation simulated protocol in removing the adhered cells. For genotypic analyzes, the presence of *icaA* and *icaD* in strains were sought related to polysaccharide production in cell adhesion and exopolysaccharide of biofilm matrix. Biofilms trials were performed in biofilm coupons incubated in biofilm reactor, comparing the adhesion with two temperatures (5°C and 35°C), two surfaces (stainless steel and polypropylene) and four contact times (3, 6, 12 hours and after cleaning and sanitizing process). To evaluate the process effectiveness in removing the adhered cells, neutral detergent (3.5% v/v) and sanitizing based on sodium hypochlorite (1000 mg.L⁻¹) were used in order to simulate the observed situation in one of the dairy products studied. The presence of *icaA* and *icaD* genes was detected in 74% and 77% of strains, respectively; 70% of the isolates showed both genes, whereas 19% of it showed no genes. The number of cells adhered on both surfaces was about 3 and 6 log₁₀ FCU.cm⁻² in temperatures of 5 °C and 35 °C, respectively, for most situations evaluated, with a significant increase over the evaluation period. In general, the temperature of 35°C favored a greater adherence of *S. aureus*. At 5°C, there was a considerable number of adhered cells, but in populations significantly lower than those observed at 35°C. The cleaning and sanitizing protocol was ineffective in removing adhered cells; a better performance of sodium hypochlorite was observed at 5°C, which should be related to lower adherence observed at this temperature. At all, the process was not able to reduce the amount of *S. aureus* adhered on both surfaces to safe levels under the conditions evaluated. The study demonstrated the ability of adhesion of isolated *S. aureus* from dairy on surfaces commonly found in Minas fresh cheese production, a situation that may favor the development of biofilms on equipment and utensils, indicating health risk to the consumers.

Keywords: Biofilms; *Staphylococcus aureus*; *ica*; Dairy, Minas fresh cheese

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Número de surtos de DTA por tipo de alimento (2000-2013)	28
Figura 2 – Número de surtos por agente etiológico (2000-2013)	29
Figura 3 – Estágios do desenvolvimento de um biofilme	34
Figura 4 – Biofilmes bacterianos visualizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
Figura 5 – Estrutura interna de biofilme maduro de <i>S. epidermidis</i> visualizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	36
Figura 6 – Modelo para função de <i>locus ica</i> na biossíntese do polissacarídeo PIA	46
Figura 7 – Fatores regulatórios envolvidos na formação de biofilmes de <i>S. aureus</i>	47
Figura 8 – Reator de Biofilmes CDC	55
Figura 9 – Reator de Biofilmes CDC durante execução do experimento	56
Figura 10 – Preparo dos cupons para análise por MEV	58
Figura 11 – Gel de agarose 1,0% contendo 10 µL de produtos de PCR a partir do DNA genômico dos isolados de <i>S. aureus</i> identificados, indicando a presença do gene <i>icaA</i>	61
Figura 12 – Gel de agarose 1,0% contendo 10 µL de produtos de PCR a partir do DNA genômico dos isolados de <i>S. aureus</i> identificados, indicando a presença do gene <i>icaD</i>	62

Figura 13 – Isolados de <i>S. aureus</i> portadores dos genes codificadores da proteína relacionada com a produção de biofilmes (<i>icaA</i> e <i>icaD</i>) coletados de 3 laticínios	62
Figura 14 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A059) em diferentes condições	69
Figura 15 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A158) em diferentes condições	71
Figura 16 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de aço inoxidável incubados a 35°C (Cepa A158)	72
Figura 17 – Lira de corte do Laticínio A com massas de queijo ressecadas e aderidas aos fios	73
Figura 18 – Tanque de coagulação de queijo com resíduos aderidos à parede interna, observado no Laticínio A	74
Figura 19 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A359) em diferentes condições	75
Figura 20 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de polipropileno incubados a 35°C (Cepa A359)	77
Figura 21 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa B190) em diferentes condições	79
Figura 22 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa B228) em diferentes condições	81
Figura 23 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de polipropileno incubados a 35°C (Cepa B228)	83
Figura 24 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupom de polipropileno incubado a 35°C (Cepa B228) com 12 horas de incubação	84

Figura 25 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa C310) em diferentes condições 86

Figura 26 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa C321) em diferentes condições 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos com biofilmes de ECP em laticínios brasileiros	39
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	53
Tabela 3 – Cepas utilizadas para os ensaios de biofilmes	56
Tabela 4 – Protocolo do processo simulado de limpeza e sanificação	59
Tabela 5 – Caracterização dos isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de diferentes pontos dos laticínios A, B e C (as letras que antecedem os números correspondem ao laticínio de origem)	63
Tabela 6 – Contagens bacterianas (Cepa A059) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	67
Tabela 7 – Contagens bacterianas (Cepa A158) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	70
Tabela 8 – Contagens bacterianas (Cepa A359) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	74
Tabela 9 – Contagens bacterianas (Cepa B190) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	78
Tabela 10 – Contagens bacterianas (Cepa B228) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	80
Tabela 11 – Contagens bacterianas (Cepa C310) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	85

Tabela 12 – Contagens bacterianas (Cepa C321) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm ⁻²)	87
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Brain Heart Infusion
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CIP – *Cleaning in Place*
CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo
CVS – Centro de Vigilância Sanitária
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – Desoxinucleotídeo
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
ECP – Estafilococos Coagulase Positiva
EPS – Exopolissacarídeo
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MS – Ministério da Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
PIA – Polissacarídeo intercelular/adesina
PSA – Polissacarídeo capsular/adesina
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA
TSA – Trypticase de Soja Agar
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
UHT – Ultra High Temperature

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações da indústria de alimentos é a garantia da qualidade microbiológica de seus produtos, visando à redução de perdas decorrentes da deterioração e à diminuição dos riscos à saúde dos consumidores (DAVIDSON; BRANEN; 2005). Nesse contexto, a questão da formação de biofilmes bacterianos em plantas processadoras de alimentos tem sido amplamente estudada nos últimos anos.

Sua ocorrência em laticínios tem relação direta com a qualidade da matéria-prima (leite cru), com o ritmo de produção cada vez mais intenso, utilização de equipamentos complexos e automação de plantas, constituindo, nesse tipo de indústria, a principal fonte de contaminação de lácteos (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006). Os maiores prejuízos causados por biofilmes consistem na corrosão de superfícies de equipamentos, no aumento da resistência a sanificantes e na contaminação microbiológica dos produtos por bactérias deteriorantes ou patogênicas (ANDRADE; PINTO; LIMA; 2008).

Dentre os principais micro-organismos contaminantes do leite e seus derivados estão os estafilococos (SANTOS, 2009; ANDRADE et al., 2011). A ocorrência de *Staphylococcus aureus* em alimentos representa um risco potencial em termos de Saúde Pública, principalmente devido à produção de enterotoxinas, capazes de desencadear um processo de intoxicação, poucas horas após sua ingestão. De acordo com dados do Serviço de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em surtos com agente etiológico conhecido, representando 20% dos casos ocorridos nos últimos anos (BRASIL, 2013).

Em relação aos alimentos mais frequentemente implicados nos surtos de intoxicação estafilocócica, queijos frescos estão entre os mais relevantes. Além dos levantamentos epidemiológicos oficiais, a contaminação de queijo Minas frescal por *S. aureus* está amplamente descrita na literatura (KOMATSU et al., 2010; PINTO et al., 2011; SILVA, 2013). Dessa maneira, o controle do patógeno em sua cadeia produtiva é urgente e imprescindível para que se garanta a qualidade do produto, que figura entre os queijos frescos mais produzidos no Brasil (SEBRAE, 2008).

Paralelamente, trabalhos têm demonstrado a capacidade de *S. aureus* formar biofilmes em materiais comumente encontrados em laticínios (SANTOS, 2009; LEE et al., 2014), evidenciando o potencial de persistência do patógeno em superfícies que entram diretamente em contato tanto com a matéria-prima (leite) quanto com o produto final (queijos), resultando em riscos à produção e à saúde do consumidor. O não-atendimento aos padrões básicos

sanitários em qualquer etapa do processamento pode favorecer a formação de biofilmes de *S. aureus* em equipamentos e utensílios.

Além dos riscos já apontados da formação de biofilmes em laticínios, tem-se observado um aumento da sua resistência aos sanificantes (MEIRA et al., 2012). Nesse contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas pesquisas acerca da eficácia de sanificantes empregados na higienização de equipamentos e utensílios em laticínios, à medida que justificam o desenvolvimento de ações para melhoria das práticas de produção, além de reforçar o controle microbiológico na planta processadora a fim de limitar a disseminação de *S. aureus* enterotoxigênico pelos queijos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui 47 espécies (71 subespécies) (EUZÉBY, 2010; DSMZ, 2012), das quais 18 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (HOLT, 1994; GILLASPY; IANDOLO, 2009), principalmente de pele e fossas nasais (SANTOS et al., 2007). Compreendem cocos dispostos em arranjo característico em formato de cachos de uva, são Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos (LANCETTE; BENNETT, 2001).

S. aureus são capazes de crescer sob temperaturas de até 6,7°C. Em geral, o crescimento ocorre na faixa de 7°C a 47,8°C, e as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C; contudo, a temperatura ótima para produção de enterotoxinas fica entre 40°C e 45°C. As temperaturas mínimas e máximas de crescimento e produção de toxinas assumem condições ótimas diferentes de acordo com outros parâmetros, como concentração de sais, atividade de água e pH. Uma característica importante das enterotoxinas é sua termoestabilidade (100°C/30 minutos), que lhes confere resistência a tratamentos térmicos, como a pasteurização. Em alimentos, a patogenicidade de estafilococos é relacionada principalmente à produção de enterotoxinas, causadoras de intoxicação (JAY, 2005).

Nos Estados Unidos, *S. aureus* encontra-se entre os agentes etiológicos mais custosos aos cofres públicos, ao lado de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Os gastos anuais estão estimados em cerca de 163 milhões de dólares (PRODUCE SAFETY PROJECT, 2010).

No Brasil, não existem estimativas dos gastos relativos a intoxicações estafilocócicas. Sabe-se, no entanto, que o patógeno está relacionado a 20% dos surtos alimentares registrados no país nos últimos anos (BRASIL, 2013). No Estado de São Paulo, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica em Saúde, no período compreendido entre 2000 e 2012, ocorreram 99 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos que apresentaram como agente etiológico *S. aureus*, envolvendo 2.693 pessoas (SÃO PAULO, 2014).

Dentre os alimentos comumente relacionados às intoxicações causadas por *S. aureus* estão produtos à base de carnes e ovos, saladas com molho, produtos de confeitaria, sanduíches, leite e derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Alimentos que requerem

manipulação considerável durante o preparo e que são mantidos à temperatura ambiente são os mais frequentemente relacionados a intoxicações estafilocócicas (JAY, 2005).

O fato de *S. aureus* ocorrer em alimentos altamente manipulados está relacionado ao seu *habitat* natural: pele e fossas nasais de humanos e também em animais. Nesse sentido, o atendimento às Boas Práticas de Fabricação, principalmente no que diz respeito às práticas de higiene de manipuladores de alimentos, é imprescindível para seu controle como veículo em casos e surtos de intoxicações alimentares. Portadores nasais de *S. aureus* e manipuladores de alimentos representam uma importante fonte do patógeno por essa via (SANTANA et al., 2010).

A ocorrência natural do patógeno em glândulas mamárias de vacas, principalmente como agente etiológico de mastites, contribui para sua ocorrência em leite e derivados (FAGUNDES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Falhas no processo de pasteurização da matéria-prima, aliadas ao não atendimento das BPF em laticínios, representam riscos à saúde do consumidor, uma vez que toxinas estafilocócicas permanecem no produto após o processamento térmico (SILVA, 2013).

Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies biológicas quanto inertes. Em muitos casos clínicos, a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica (ARCHER et al., 2011). Ademais, estafilococos em biofilmes demonstram elevada resistência a antimicrobianos, o que pode comprometer ainda mais o tratamento e seu controle (MATHUR et al., 2005).

Na indústria, a formação de biofilmes é um problema no mundo todo. Além das implicações em Saúde Pública pela disseminação de patógenos via alimentos, biofilmes podem reduzir a vida útil de equipamentos, causando perdas econômicas significativas. Somam-se a isso os problemas decorrentes do aumento da resistência bacteriana a sanificantes, o que agrava o problema de sua ocorrência no ambiente de processamento de alimentos (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

2.2 Leite e derivados como veículos de *S. aureus*

Em termos de qualidade microbiológica, um dos principais problemas para a atividade de produção leiteira é a mastite bovina, tanto por conta de sua elevada frequência, quanto pelos prejuízos econômicos que causa. Na mastite clínica, são observadas alterações nas glândulas mamárias, como inchaço, edema, hiperemia, calor e dor à palpação. O leite também sofre alterações em sua composição, podendo apresentar grumos, pus e/ou sangue. Na mastite subclínica, entretanto, não são observadas alterações clínicas no animal, tampouco alterações macroscópicas no leite, o que torna esse tipo de mastite um grande problema para a atividade leiteira e, conseqüentemente, para a indústria de lácteos (ALFIERI, 2008).

Micro-organismos patogênicos têm sido encontrados com frequência em leite e derivados comumente armazenados sob temperaturas inadequadas e consumidos sem qualquer tipo de tratamento térmico (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002). Queijos frescos estão frequentemente implicados em casos e surtos de toxinfecções alimentares, cujo principal agente etiológico identificado é o *S. aureus* (BRASIL, 2009).

Queijos são veículos frequentes de patógenos de origem alimentar, em especial os queijos frescos artesanais, uma vez que não sofrem processo de maturação durante seu preparo. Dessa maneira, a contaminação bacteriana comum nesse tipo de produto é de grande relevância para a indústria de lácteos (FEITOSA et al, 2003).

O queijo Minas frescal é caracterizado pelo alto teor de umidade, baixa concentração de sal, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, características que, aliadas ao fato do processamento ser altamente manipulado, o tornam suscetível à deterioração microbiana e ao crescimento de microrganismos patogênicos (CÂMARA et al., 2002; POÇAS; PINTADO, 2009).

A temperatura utilizada no processo de fabricação do Minas frescal, em torno de 35-40°C, favorece a multiplicação bacteriana. A situação pode ficar ainda mais desfavorável pela exposição desses produtos a temperaturas de abuso durante o armazenamento e transporte, como quebras da cadeia do frio, que favorecem ainda mais a multiplicação de bactérias contaminantes pós-processo. Dentre os fatores que afetam a qualidade microbiológica do queijo, estão a má qualidade do leite e falhas no processamento (SILVA, 2013).

Dados divulgados pelo Serviço de Vigilância Sanitária (Figura 1) mostram que leite e derivados estão entre os principais veículos de DTA no Brasil. Apesar de representar, diretamente, o sexto alimento mais envolvido nos surtos, as classes nomeadas “alimentos mistos” e “doces e sobremesas” compreendem também produtos lácteos, o que aumenta sua

importância como veículos de disseminação de micro-organismos patogênicos. No período compreendido entre 2000 e 2013, ocorreram 337 surtos de DTA relacionados ao consumo de leite e derivados; no entanto, considerando-se que os dados no país são subestimados, esse número certamente é maior.

Figura 1 – Número de surtos de DTA por tipo de alimento (2000-2013) (BRASIL, 2013)

Em relação aos principais agentes etiológicos de DTA no período, os dados demonstram a importância epidemiológica de *S. aureus* (Figura 2), que aparece em segundo lugar, sendo o primeiro a *Salmonella* spp. Representa 20% dos surtos notificados com agente etiológico identificado (763/3872). Levando-se em consideração que grande parte dos surtos não apresenta agente etiológico conclusivo ou identificado – cerca de 50% dos casos (4874/8746) – a relevância da espécie como agente etiológico de intoxicações alimentares é certamente superior.

Figura 2 – Número de surtos por agente etiológico (2000-2013) (BRASIL, 2013)

Os padrões microbiológicos para queijos frescos estabelecidos pela RDC 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), toleram até 10^3 UFC.g⁻¹ de estafilococos coagulase positiva em queijos de umidade muito alta (em torno de 55%) e elaborados com bactérias lácticas abundantes e viáveis, e até 5×10^2 UFC.g⁻¹ em queijos elaborados por coagulação enzimática sem a adição de bactérias lácticas. Muitos trabalhos, entretanto, têm demonstrado a presença de ECP em populações superiores aos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Pinto et al. (2011) observaram a ocorrência de *S. aureus* em 100% das amostras de queijo Minas frescal produzido artesanalmente no município de Santa Helena-PR, todas com contagens acima do permitido pela legislação. Números também expressivos foram encontrados por Komatsu et al. (2010), pois 88% das amostras de queijo Minas frescal comercializadas na cidade de Uberlândia-MG encontravam-se fora dos padrões. Nesses queijos, a população de ECP variou entre 10^4 e 10^5 UFC.g⁻¹ de alimento. Passos et al. (2009) observaram ocorrência de *S. aureus* em 50,5% das amostras de queijo Minas frescal comercializadas em cidades do Estado do Paraná, com a maioria das amostras apresentando contagens superiores a 10^4 UFC.g⁻¹ de queijo.

Martins et al. (2012) detectaram essa bactéria em 45% das amostras de queijo Minas frescal comercializadas no município de Frutal-MG; em todas elas, em níveis superiores a 10^3 UFC.g⁻¹, caracterizando-as como impróprias para o consumo. Zocche et al. (2012) detectaram ECP em 10,7% das amostras de queijo Minas frescal comercializadas na cidade de Pelotas-RS

e todas apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC.g⁻¹, estando fora dos padrões estabelecidos pela ANVISA.

Frequências menos expressivas foram detectadas por Salotti et al. (2006), com 20% das amostras de queijo Minas Frescal artesanais acima dos padrões determinados pela legislação vigente, e também por Carvalho (2003) em amostras industriais (7,5%). De qualquer maneira, reforçam a necessidade de adequação do processo de produção de queijos a fim de se assegurar a qualidade microbiológica dos produtos oferecidos ao consumidor.

A espécie de ECP de maior ocorrência em leite e derivados é *S. aureus*. Lamaita et al. (2005) analisaram a frequência de diferentes espécies de ECP isoladas de leite cru refrigerado em propriedades do Estado de Minas Gerais. Das 436 cepas isoladas de um total de 80 coletas realizadas, 34,6% foram identificadas como *S. aureus*.

Borges et al. (2008) detectaram a presença de ECP em diferentes etapas da linha de produção de queijo de coalho. Dos 68 isolados obtidos, identificaram 12 diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., dentre as quais constava *S. aureus* (29,4%), isolados de leite cru, queijo e mesa de enformagem. Andrade et al. (2011) também avaliaram a presença de *Staphylococcus* spp. nesse tipo de queijo. Dos 193 isolados, foram identificadas 14 espécies diferentes, sendo 11 coagulase-negativa e 3 coagulase-positiva. *S. aureus* correspondeu a 54,9% das amostras analisadas.

Lee et al. (2014) detectaram *S. aureus* em ambiente de ordenha em diferentes pontos de coleta em 10 propriedades do Estado de São Paulo. O micro-organismo foi encontrado em amostras de leite de vacas com mastite subclínica, leite armazenado em tanques de expansão, superfícies de equipamentos utilizados na ordenha das vacas e mãos de manipuladores. Apesar da baixa incidência detectada (6,6% das amostras coletadas), o estudo demonstrou a persistência do patógeno no ambiente de ordenha, ressaltando a necessidade de práticas higiênicas a fim de se reduzir os riscos de veiculação da bactéria em leite e derivados.

Estudo de Silva (2013) revelou a ocorrência de *S. aureus* produtores de toxinas em 3 laticínios do Estado de São Paulo. O micro-organismo foi detectado em amostras de leite cru e pasteurizado, superfícies de equipamentos, mãos de manipuladores e queijo Minas frescal. A autora alerta para o fato de ter encontrado *S. aureus* em leite pasteurizado e queijos, mesmo após a matéria-prima ser processada termicamente para a eliminação de micro-organismos patogênicos, reafirmando o risco da veiculação de alimentos contaminados e com toxinas pré-formadas para consumidores de queijos Minas frescal.

2.3 Biofilmes bacterianos

Biofilmes são definidos como uma comunidade bacteriana aderida a superfícies, abarcada por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS). Cada biofilme se desenvolve em um micro nicho particular, caracterizado pela cooperatividade metabólica e por um sistema de circulação e homeostase primitivos (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1995).

Em outra definição, Donlan (2002) caracteriza biofilmes como um conjunto de células bacterianas associado irreversivelmente a uma superfície e encerrado em uma matriz de polissacarídeos.

Por sua vez, Sauer, Rickard e Davies (2007) definem biofilmes como micro-organismos aderidos a superfícies e envoltos por uma matriz polimérica hidratada de síntese própria, constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominados coletivamente de exopolissacarídeos (EPS). Tal matriz permite o desenvolvimento da comunidade bacteriana, mediante a circulação de água, nutrientes e eliminação de metabólitos e resíduos.

Do ponto de vista ecológico, populações bacterianas emergem a partir de células individuais, e as populações metabolicamente similares formam, por sua vez, agrupamentos intimamente associados. Diferentes agrupamentos que conduzem processos fisiológicos interdependentes compreendem o que é conhecido por comunidade bacteriana. Em sua essência, biofilmes são constituídos por comunidades bacterianas interdependentes (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

Biofilmes podem ser compostos por comunidades homogêneas, derivadas de uma única espécie ou por comunidades heterogêneas, formadas por comunidades de várias espécies bacterianas ou até mesmo por fungos, leveduras, algas e outros organismos unicelulares. O primeiro caso é raro e incomum na natureza. Biofilmes heterogêneos são os mais comumente encontrados (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007).

Quando o biofilme é composto por espécies heterogêneas, os subprodutos metabólicos de um micro-organismo podem favorecer e suportar o crescimento de outra espécie, enquanto que a adesão de uma espécie pode fornecer sítios para a ligação e fixação de outras espécies bacterianas. No entanto, a competição por nutrientes e o acúmulo de subprodutos tóxicos gerados pelos colonizadores primários podem limitar a diversidade de espécies dentro do biofilme (DUNNE, 2002).

Um dos principais mecanismos de manutenção das atividades de um biofilme está intimamente relacionado com mecanismos de *quorum-sensing* (HAMMER; BASSLER, 2003; SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005; YU et al., 2012), que consistem basicamente

na produção e liberação de moléculas sinalizadoras e auto-indutoras, cuja concentração aumenta em função da densidade populacional bacteriana. Bactérias são capazes de detectar um determinado limiar de estimulação dessas moléculas auto-indutoras, promovendo alterações na expressão genética, e, por conseguinte, num determinado comportamento. Dessa maneira, bactérias de uma comunidade podem sincronizar suas atividades, funcionando como organismos multicelulares (WATERS, 2005).

A maioria das espécies bacterianas é capaz de produzir EPS. Cada bactéria produz EPS com características distintas em termos de composição. Espécies como *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* produzem EPS constituídos principalmente por alginatos; *Xanthomonas campestris* produz biofilmes ricos em xantana (SUTHERLAND, 1997); *Staphylococcus* sp. produz um polissacarídeo denominado PIA, e *Escherichia coli*, por sua vez, produz PGA, denominações referentes a um mesmo polissacarídeo, o poli-N-acetilglicosamina (KAPLAN, 2004).

A maior parte da matriz de um biofilme, correspondendo em geral a 97%, é constituída por água, proporção que pode variar de um sistema para outro. Esse volume corresponde tanto à água intracelular, constituinte natural das células bacterianas, como à água circundante, que, junto com os solutos dissolvidos, determinam as características de viscosidade da matriz e condições de difusão de solutos em seu interior, como nutrientes e metabólitos. Material celular, propriamente dito, pode representar cerca de 2 a 15% da estrutura do biofilme, apesar de componentes secretados corresponderem à grande parte da sua fração sólida, como exopolímeros, metabólitos e produtos de lise celular. Dessa forma, as principais classes de macromoléculas encontradas no biofilme – proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA – encontram-se juntamente a peptidoglicanos, lipídeos, fosfolipídeos e outros componentes da matriz (FRØLUND, 1996; SUTHERLAND, 2001).

Segundo Notermans, Dormans e Mead (1991), a formação de biofilmes bacterianos ocorre em três etapas distintas: adesão, consolidação e colonização. No processo de adesão, forças físicas desempenham um papel fundamental, permitindo a aderência das células bacterianas a quase todos os tipos de superfície, inclusive em equipamentos usados no processamento de alimentos. Após a etapa inicial, bactérias começam a produzir uma camada de substâncias extracelulares (EPS), tornando a adesão irreversível (etapa de consolidação). A camada de EPS permite o estabelecimento e multiplicação das células bacterianas na superfície, resultando no biofilme maduro (etapa de colonização), com consequente liberação de células para o meio circundante.

A adesão de células bacterianas na superfície é influenciada por fatores como natureza do substrato, temperatura, presença de flagelos e o estágio de desenvolvimento bacteriano (HOURY et al., 2010; PAGEDAR; SINGH, 2012; VISVALINGAM; HOLLEY, 2013). Esse processo pode ser dividido em dois estágios distintos: o estágio primário (ou de encaixe) e o secundário (ou de bloqueio) (DUNNE, 2002).

O primeiro estágio compreende o encontro entre o micro-organismo e a superfície e é considerado reversível, sendo influenciado por interações não-específicas, relacionadas principalmente à tensão superficial, hidrofobicidade e forças eletrostáticas. Esse contato inicial entre célula e superfície pode ocorrer casualmente (células dispersas em um fluido que entra em contato com a superfície), ou por quimiotaxia ou motilidade. Alcançado um limite crítico de proximidade entre célula e superfície – que corresponde geralmente a 1 nm – a adesão é determinada pela soma de forças atrativas ou repulsivas geradas entre as duas partes, que podem compreender interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de van der Waals, forças hidrodinâmicas, dentre outras. Interações hidrofóbicas têm maior influência sobre a adesão primária, já que interações eletrostáticas tendem a promover a repulsão entre as partes, uma vez que a maioria das bactérias e superfícies inertes são carregadas negativamente (DUNNE, 2002; SUTHERLAND, 2001; CARPENTIER, 1993).

No caso de *S. aureus*, a carga elétrica dos ácidos teicóicos presentes na superfície exerce um importante papel nas etapas iniciais da formação de biofilme, especificamente no momento da adesão da bactéria à superfície. Alterações induzidas na carga elétrica negativa da parede celular revelaram um aumento das forças de repulsão entre a bactéria e a superfície, impedindo a aderência bacteriana a superfícies como vidro ou poliestireno. Dessa maneira, a constituição dos ácidos teicóicos em *S. aureus* exerce um papel fundamental na expressão de um fenótipo positivo para a produção de biofilmes (GROSS et al., 2001; FITZPATRICK et al. 2005).

O segundo estágio (secundário ou de bloqueio) é a fase de fixação propriamente dita, e envolve ligações mediadas por estruturas bacterianas e pela superfície. A adesão é consolidada pela produção de exopolissacarídeos, os quais se complexam com a superfície por meio de receptores localizados nas fímbrias ou fibrilas bacterianas. Nesse momento, o micro-organismo encontra-se ligado firmemente à superfície e na ausência de intervenção física ou química, a célula bacteriana não se desprende, o que caracteriza a adesão irreversível (Figura 3). Dentre esses exopolissacarídeos, encontram-se as adesinas, as quais exercem um importante papel na formação de biofilmes de estafilococos, seja na adesão do micro-

organismo à superfície, seja na adesão de células umas às outras (DUNNE, 2002). Sua expressão gênica é discutida no item 2.5.

Figura 3 – Estágios do desenvolvimento de um biofilme. 1) adesão reversível com a formação de micro-colônias; 2) etapa de consolidação (adesão irreversível com a produção de EPS e formação de estruturas com formato típico de cogumelos); 3) colonização (biofilme maduro) e ruptura da estrutura com liberação de células. QS: *quorum sensing*. Adaptado de Trentin, Giordani e Macedo (2013)

Ocorrida a adesão, inicia-se o processo de consolidação do biofilme. Nessa etapa, células bacterianas passam a apresentar um metabolismo celular distinto, diferentemente de células planctônicas da mesma espécie (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1995). Expressam, inclusive, fenótipos diferenciados, dependendo de sua localização na estrutura do biofilme. Células bacterianas de biofilmes apresentam um significativo aumento de resistência frente a situações limitantes, quando comparadas com culturas planctônicas, tais como deficiência de nutrientes, baixo pH, baixa atividade de água, presença de sais e antimicrobianos (MCLANDSBOROUGH et al., 2006).

A matriz de EPS é altamente complexa. Seus componentes internos – principalmente água, carboidratos e proteínas – oferecem uma diversidade de condições e gradientes osmóticos, em constante dinamismo. Em todo o biofilme, tais condições contribuem para a heterogeneidade da matriz e para sua função multicelular (SUTHERLAND, 2001; LIU; LIU; TAY, 2004). O arranjo dos componentes estruturais da matriz permite o fluxo de líquidos, responsáveis pelo suprimento de nutrientes e pela eliminação de substâncias metabólicas (MCLANDSBOROUGH et al., 2006).

Estudos com microscopia eletrônica têm possibilitado a visualização da estrutura de biofilmes bacterianos, que difere dentre as espécies (Figura 4). As estruturas proteicas de um biofilme assumem uma conformação que permite às células realizar atividades de motilidade, conjugação, distribuição de nutrientes, agregação de novas células, entre outras (Figura 5). Ademais, uma vez que o EPS não apresenta resistência à tração, toda a estrutura do biofilme lhe confere condições de viscoelasticidade, contribuindo para sua resistência a forças de cisalhamento externas (SCHAUDINN et al., 2007).

Figura 4 – Biofilmes bacterianos visualizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A: *B. cereus* (LONGHI et al., 2008); B: *Staphylococcus* spp. (DONLAN, 2002)

Figura 5 – Estrutura interna de biofilme maduro de *S. epidermidis* visualizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Células associadas à matriz extracelular (EPS) com arranjo regular em forma de favo de mel. Fonte: SCHAUDINN et al., 2007

Na última etapa, o biofilme bacteriano maduro compreende um verdadeiro consórcio de bactérias colonizadoras associado à matriz de EPS, além de partículas externas e detritos depositados. Tal estrutura pode causar o desprendimento de bactérias planctônicas e subprodutos, como toxinas (MITTELMAN, 1998). A criação de um ambiente anaeróbico no interior do biofilme maduro promove o aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis, capazes de enfraquecer sua estrutura, resultando no desprendimento de células ou fragmentos, o que também pode ser reflexo do fluxo de líquido circundante (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

Biofilmes proporcionam um nicho ideal para transferência de DNA extra-cromossômico (plasmidial). Sua estrutura favorece significativamente a transferência horizontal de genes entre as células. Essa característica permite que determinados clones contribuam para um alto índice de manutenção de genes, o que não é comumente observado em células planctônicas. A expressão fenotípica decorrente das alterações genéticas entre membros de um biofilme bacteriano é controlada por fatores ambientais que ativam ou inibem sistemas regulatórios bacterianos, principalmente pela parceria metabólica típica da estrutura do biofilme (FRØLUND, 1996; COSTERTON, 2007).

Células bacterianas que compõem um biofilme expressam características fisiológicas distintas de bactérias planctônicas. Essa diferença relaciona-se principalmente à expressão

gênica diferenciada observada em comunidades microbianas de biofilmes, padrões não encontrados em células de vida livre (DAVIES; BRESLIN, 2003). Tal diferenciação pode afetar a eficiência de antimicrobianos. Drogas com mecanismos de ação distintos, como inativação enzimática, inibição do metabolismo e da síntese de DNA, e que são eficazes na destruição de células planctônicas, também têm sua eficiência reduzida em biofilmes. Além, disso, alguns agentes bactericidas, como os derivados de cloro, reagem primeiramente com a matriz de exopolissacarídeos, perdendo sua atividade antes de atingirem as células mais internas do biofilme (FLEMMING et al., 2005; MONROE, 2007).

2.4 Biofilmes em laticínios

Um dos problemas mais significativos para o setor de leite e derivados, quanto à segurança microbiológica, consiste na formação de biofilmes em plantas de processamento. A presença de biofilmes em superfícies de plantas e equipamentos parece ser um dos principais focos de contaminação de produtos lácteos por bactérias patogênicas. A gravidade do problema fica evidente quando se observa o grande número de trabalhos publicados que indicam a persistência de patógenos envolvidos em DTA em superfícies que entram diretamente em contato com alimentos por períodos de tempo prolongados (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

Na indústria de alimentos, a formação de biofilmes está condicionada a diferentes variáveis, como *design* adequado de equipamentos, qualidade da matéria-prima, eficiência do processo de higienização, dentre outros. O não-atendimento às exigências de qualidade em qualquer etapa do processamento na indústria pode favorecer a formação de biofilmes, acarretando contaminações no produto final e conferindo riscos à saúde dos consumidores, por meio da veiculação de patógenos (KUMAR; ANAND, 1998; JOSEPH et al., 2001).

As elevadas quantidades de resíduos resultantes do processamento de alimentos favorecem a formação de biofilmes em equipamentos, fornecendo proteção aos micro-organismos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Na indústria de laticínios, resíduos de leite, especialmente proteínas e sais minerais – como fosfato de cálcio – geralmente são constituintes da matriz de biofilmes em tanques e tubulações (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

A compreensão da influência de todas as variáveis envolvidas na formação de biofilmes, como composição da superfície, tipos de resíduos presentes (carboidratos, gorduras, proteínas e sais minerais) e espécies bacterianas auxilia no entendimento do

processo de estabelecimento do biofilme e no seu controle dentro da indústria (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Características da superfície de equipamentos industriais, como composição e estado de conservação, refletem diretamente na formação de biofilmes (JOSEPH et al., 2001). Apesar de sua aparente uniformidade, superfícies de equipamentos, quando observadas microscopicamente, revelam muitas fendas e ranhuras, dentro das quais micro-organismos podem se aderir e iniciar o processo de formação de biofilmes (STONE; ZOTTOLA, 1985).

Dentre os materiais mais utilizados na indústria de alimentos, está o aço inoxidável, liga composta por carbono, cromo e níquel. Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18% de cromo e 8% de níquel são os mais utilizados. Nesse grupo, estão as ligas da classe 300 – 304 e 316, por exemplo – que são mais resistentes, devido à película protetora de óxido de cromo que se forma na presença de oxigênio. Em condições de maior corrosividade, como em salmouras, opta-se pela classe 316, por conter mais níquel em sua composição (10%), e, ainda, de 2 a 3% de molibdênio (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

A superfície de escolha para o estudo dos biofilmes deve levar em consideração aspectos inerentes aos equipamentos e utensílios utilizados nos laticínios, bem como particularidades de cada uma das metodologias empregadas para determinação e quantificação do biofilme. Em estudos de biofilmes em laticínios, é comum a utilização do aço inoxidável como superfície de escolha para avaliação da adesão bacteriana, uma vez que grande parte dos equipamentos e utensílios utilizados nesse ambiente, como tubulações, silos, tanques de leite, pasteurizadores, mesas de dessoragem, desnatadeiras, agitadores e liras são constituídos desse tipo de material.

No Brasil, alguns estudos têm apontado a ocorrência de cepas de *S. aureus* potencialmente produtoras de biofilmes em propriedades rurais e laticínios, isoladas a partir de amostras de leite, equipamentos, superfícies e mãos de manipuladores (Tabela 1).

Tabela 1 – Estudos com biofilmes de ECP em laticínios brasileiros

Procedência	Local de coleta	% cepas biofilme+	Material	Estado	Referência
Micro-usina de beneficiamento de leite	Tanques de recepção/estocagem de leite Pasteurizador Máquina de envase	25,0%	Aço inox	SP	Santos, 2009
Fazendas de gado leiteiro	Leite de vacas com mastite subclínica	80,0%	Plástico	RJ	Coelho et al., 2011
Fazendas de gado leiteiro	Leite de vacas com mastite subclínica	98,9%	Poliestireno	SP	Melo et al., 2012
Fazendas de gado leiteiro	Leite de vacas com mastite subclínica	76,8%	Poliestireno	RJ	Marques et al., 2013
Ambientes de ordenha	Peneiras, baldes Insufladores Mãos/ordenhadores	41,9%	Aço inox	SP	Lee et al., 2014

Lee et al. (2014) estudou a ocorrência de *S. aureus* produtores de biofilmes em ambiente de ordenha de propriedades localizadas no Estado de São Paulo. Do total de isolados obtidos de leite, tanques, equipamentos e manipuladores, 41,9% foram considerados capazes de produzir biofilmes em aço inoxidável. Não foi realizada a detecção de genes *ica* no referido estudo, apenas a demonstração da formação de biofilmes em ensaios de microplacas. A autora relaciona a alta porcentagem de cepas biofilme-positivas encontrada em tanque de expansão aos riscos de contaminação do produto, uma vez que biofilmes formados nesses locais podem constituir um foco constante de disseminação da bactéria no leite e seus derivados.

Marques et al. (2013) avaliaram a produção de biofilmes em amostras provenientes de leite de vacas com mastite de propriedades leiteiras do Estado do Rio de Janeiro. O estudo indicou uma frequência de 7,8 e 23,5% dos genes *icaA* e *icaD* na cepas de ECP avaliadas, respectivamente. Apesar da baixa frequência encontrada, 84,3% das cepas avaliadas foram caracterizadas como produtoras de biofilmes. Os autores ressaltam que tal discrepância se deve à expressão de outros genes envolvidos na formação de biofilmes, não mediados pelo operon *ica*.

Em estudo de Melo et al. (2012), observou-se uma alta correlação entre a produção de biofilmes e a presença de genes *ica* em amostras isoladas de leite obtidos de vacas com mastite subclínica de propriedades rurais do Estado de São Paulo. A produção de matriz de

EPS foi detectada em 98,9% das estirpes de *S. aureus* analisadas; os genes *icaA* e *icaD* foram encontrados em 95,7% delas. Os autores afirmam que os resultados encontrados no estudo sugerem fortemente que a produção de biofilmes observada deve ser expressa principalmente pelos genes do *operon ica*.

Coelho et al. (2011) avaliaram o potencial de formação de biofilmes de 50 cepas de *S. aureus* isoladas de leite ordenhado de vacas com mastite subclínica em 15 diferentes propriedades do Estado de Rio de Janeiro. A produção de biofilmes *in vitro* foi observada em 80% das amostras analisadas. Em relação à análise genotípica, as amostras foram positivas para os genes *icaA* e *icaD* na proporção de 14 e 12% das cepas, respectivamente; ambos os genes foram isolados em 7,3% do total de amostras. Segundo esses autores, a discrepância entre o total de cepas formadoras de biofilmes e as que apresentaram genes *ica* pode estar relacionada ao fato dessas cepas apresentarem e expressarem outros genes relacionados à produção de biofilmes não relacionados ao cluster *ica*, como o gene *bap*, por exemplo.

Santos (2009) investigou a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* spp. com potencial para a formação de biofilmes em uma micro-usina de beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, em superfícies de aço inoxidável antes e após a higienização das mesmas. Dentre as 16 cepas isoladas, 4 (25%) apresentaram o gene *icaA*, e para o gene *icaD*, todas as cepas avaliadas foram positivas. A detecção de genes para formação de biofilmes em ECP isolados de superfícies antes e após a higienização reafirma a importância desse tipo de estudo para sua epidemiologia em laticínios brasileiros.

Em relação ao controle de biofilmes em laticínios, o uso adequado de agentes de limpeza é imprescindível. A correta seleção das soluções de limpeza, como detergentes e sanificantes, depende de fatores como eficácia, segurança e facilidade de remoção após a aplicação, levando-se em consideração também o caráter corrosivo de cada um desses agentes, bem como a ocorrência de efeitos sensoriais nos produtos obtidos após sua aplicação e remoção (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Agentes de limpeza nem sempre são aplicados adequadamente, não sendo eficazes na remoção da matéria orgânica de superfícies de equipamentos. A escolha do detergente mais adequado às condições de produção da planta de processamento depende dos principais contaminantes mais comumente encontrados – que varia para cada tipo de alimento produzido – bem como do tipo de material que compõe a superfície do equipamento e das instalações (DOSTI; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, 2005).

A maioria dos detergentes utilizados em laticínios são compostos alcalinos, específicos para remoção de gordura e proteína. Tais agentes podem ser utilizados em combinação com

agentes quelantes ou sequestrantes, desde que sejam compatíveis entre si. Em laticínios é imprescindível a utilização periódica de detergentes ácidos para remoção completa de resíduos minerais – como por exemplo, cristais de cálcio que se depositam nas superfícies de equipamentos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Utiliza-se, comumente, hidróxido de sódio (NaOH) como agente cáustico e ácido nítrico (HNO_3) como detergente ácido. Em relação aos sanificantes, uma grande variedade tem sido aplicada para eliminação de bactérias deteriorantes, patogênicas e esporos de superfícies de equipamentos, tais como compostos de quaternário de amônio, ácidos aniônicos, iodóforos e sanificantes à base de cloro, sendo o mais comum o hipoclorito de sódio (BREMER; FILLARY; MCQUILLAN, 2006).

Seu componente ativo, o ácido hipocloroso (HOCl), apresenta baixo peso molecular e ausência de carga elétrica, características que facilitam sua penetração na parede bacteriana, ocasionando a lise e consequente morte do micro-organismo (MAILLARD, 2002; DEQUEIROZ, 2004). Dessa maneira, sua aplicação como sanificante de superfícies e equipamentos na indústria tem por objetivo a prevenção da contaminação de lotes distintos por bactérias deteriorantes, destruição de bactérias patogênicas e prevenção da formação de biofilmes em plantas de processamento de alimentos.

O tempo mínimo de exposição ao hipoclorito de sódio depende de regulamentações, as quais levam em consideração o tipo de superfície e as condições específicas da planta de processamento em questão. Nos Estados Unidos, a recomendação para sanificação de superfícies que entrem em contato com alimentos em geral é de 200 mg.kg^{-1} (sem enxágue), podendo variar de 600 a 1200 mg.kg^{-1} de cloro livre durante 10 minutos (com enxágue) (FAO, 2009). No Brasil, para desinfecção de superfícies recomenda-se a aplicação de solução de cloro orgânico ou hipoclorito de sódio de 100 a 250 mg.L^{-1} , com tempo mínimo de contato de 15 minutos (SILVA JR., 2002).

Concentrações recomendadas para destruição de células planctônicas podem não ser suficientes para a completa remoção de biofilmes; no caso de biofilmes de *S. aureus*, essas concentrações são consideravelmente superiores. Luppens et al. (2002) avaliaram a atividade de hipoclorito de sódio sobre biofilmes de estafilococos e verificaram a necessidade de uma concentração 600 vezes maior para causar a morte de células bacterianas de um biofilme quando comparada com células planctônicas.

Vários fatores têm sido propostos para explicar a baixa suscetibilidade das células bacterianas de um biofilme a agentes antimicrobianos, incluindo baixa penetração dos agentes químicos, dificuldade de acesso dos mesmos às células, transferência horizontal de genes de

resistência e crescimento celular lento nas camadas mais internas do biofilme (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Nesse último caso, a atividade metabólica da comunidade bacteriana de um biofilme varia em função da profundidade em que se encontram suas células, na estrutura do mesmo. Células presentes nas camadas mais externas, de acesso rápido às condições do meio, são geralmente as que apresentam maior atividade metabólica. Células mais internas, nas camadas mais basais do biofilme, são menos ativas, podendo permanecer em estado de dormência, fornecendo uma estratégia eficaz para a manutenção do biofilme após a aplicação de um agente antibacteriano (DAVIES, 2003).

Um dos procedimentos de higienização característico de laticínios é o Sistema CIP (*Cleaning In Place*). Nesse sistema, realiza-se pré-enxágue com água à temperatura de 38 a 46°C, durante 40 segundos, para eliminação de resíduos aderidos às superfícies, seguido de limpeza com solução alcalina à 80°C/15 minutos, visando à retirada de resíduos orgânicos, lipídeos e proteínas. Segue-se com enxágue a frio durante 20 segundos, lavagem com solução ácida a 70°C/10 minutos, para eliminação de resíduos inorgânicos, e enxágue com água morna. Por fim, realiza-se a sanificação (compostos clorados/ácido peracético) sob temperaturas e períodos pré-determinados (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Como a eficiência do processo depende do tipo de produto e das variáveis específicas de cada planta de processamento, as condições ótimas para um sistema CIP variam entre as indústrias de laticínios. O estudo dessas variáveis visando à sua otimização *in loco* é complexo, devido à grande dimensão das plantas e ao foco na produção, qualidade e segurança do produto final (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

Estudos têm avaliado diferentes variáveis no processo de higienização de superfícies e remoção de biofilmes bacterianos. Vázquez-Sánchez et al. (2014) avaliaram a eficácia de diferentes sanificantes na remoção de biofilmes de *S. aureus*, dentre eles o ácido peracético, cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio. Segundos os autores, os biofilmes demonstraram ser mais resistentes a tais agentes quando comparados com células planctônicas. O ácido peracético mostrou-se mais eficiente na remoção dos biofilmes, seguido do hipoclorito de sódio e do cloreto de benzalcônio. Os autores alertaram para o fato das doses recomendadas pelos fabricantes dos sanificantes estarem abaixo das observadas para a completa remoção dos biofilmes em condições próximas às encontradas em plantas de processamento de alimentos.

Meira et al. (2012) avaliaram a remoção de biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável e polipropileno por ácido peracético e hipoclorito de sódio. Os autores observaram uma

considerável redução da população bacteriana aderida nas duas superfícies, da ordem de 2 UFC.cm⁻²; enfatizaram, no entanto, a ineficácia dos sanificantes empregados na completa eliminação do biofilme formado para todas as situações avaliadas, reforçando a necessidade de novas pesquisas acerca da capacidade de adesão de *S. aureus* em superfícies encontradas em plantas processadoras de alimentos.

Furukawa et al. (2010) avaliaram a eficácia de diferentes agentes de limpeza e sanificação utilizados em CIP contra biofilmes bacterianos em superfícies de aço inoxidável. Biofilmes de *S. aureus* foram menos susceptíveis aos agentes quando comparados aos de *E. coli*. Detergentes ácidos e alcalinos fortes foram capazes de remover significativamente os biofilmes formados. No entanto, um dos agentes à base de ácido fosfórico 40% (v/v) mostrou fraca atividade contra biofilmes de *S. aureus*.

Travagin (2010) avaliou a eficiência do sistema CIP na remoção de biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável simulando um processo utilizado em laticínios, com a utilização de sanificante à base de quaternário de amônio. Os resultados apontaram ação satisfatória do processo CIP na remoção dos biofilmes estudados. Estudo de Tang et al. (2010) avaliou a eficácia de diferentes agentes de higienização na remoção de biofilmes de *Klebsiella oxytoca* em equipamentos utilizados na indústria de laticínios. Todos os sanificantes empregados foram eficientes na remoção dos biofilmes; particularmente, um sanificante enzimático apresentou melhor potencial de redução de biofilmes em comparação com outros agentes estudados.

2.5 Expressão gênica de biofilmes em *S. aureus*

O início da formação de biofilmes de *S. aureus* envolve a produção de dois polissacarídeos, em fases distintas. Em um primeiro momento, células bacterianas aderem-se à superfície inerte; essa adesão é mediada por um antígeno capsular denominado Polissacarídeo capsular/adesina (PSA). Uma vez aderidas, ocorre a produção do Polissacarídeo intercelular/adesina (PIA), responsável pela adesão intercelular. Tanto PSA quanto PIA apresentam estruturas semelhantes, diferindo apenas em alguns grupos amina (VASUDEVAN et al., 2003).

A regulação da expressão de proteínas celulares de adesão envolvidas na formação dos biofilmes é complexa. Estudos recentes têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na expressão de proteínas de fixação e de EPS e sua consequente

influência na formação de biofilmes de estafilococos, trazendo novas informações acerca da complexidade de todo o processo regulatório (ATKIN, 2014).

A expressão gênica relacionada à capacidade de adesão bacteriana a superfícies inertes é influenciada por estímulos ambientais que ativam ou inibem sistemas reguladores da transcrição. Estudos realizados com *Staphylococcus* sp. têm demonstrado a importância da regulação gênica para a expressão de proteínas celulares de fixação, bem como a produção de EPS, em resposta a estímulos externos, como densidade populacional, tensão ou limitação de nutrientes (CHOKR et al., 2006; HENNIG; NYUNT-WAY; SUN, 2007; YOU et al., 2014).

A relação entre o potencial de formação de biofilmes e a presença de genes *ica* tem sido demonstrada em diversos estudos. Ficou evidente que a produção de polissacarídeos mediada pela expressão de genes do *operon icaABCD* é uma importante via relacionada à capacidade de adesão e formação de biofilmes em estafilococos, considerado, esse, como um importante mecanismo de patogenicidade do gênero (VASUDEVAN et al., 2003; COELHO et al., 2011; LEE et al., 2014).

Inicialmente isolado a partir de *S. epidermidis*, o PIA foi um dos primeiros fatores de mediação da formação de biofilmes descritos na literatura; atualmente, sabe-se que o *operon icaABCD* está presente em praticamente todas as espécies do gênero *Staphylococcus*. Esse polissacarídeo está relacionado tanto com os mecanismos de adesão à superfície, quanto com a adesão entre as células que compõem o biofilme bacteriano (ROHDE et al., 2007). Além disso, confere proteção à comunidade do biofilme, uma vez que promove resistência a tensões físicas e mecânicas externas e à ação de componentes antibacterianos (KAPLAN et al., 2004).

Em algumas cepas de *S. aureus* a expressão de biofilmes ocorre de maneira independente à expressão do *operon icaABCD*, pois a produção de uma grande variedade de outras proteínas de adesão permite o estabelecimento do biofilme em superfícies inertes, e, conseqüentemente, a produção de biofilmes – como as Bap, SasG, FnBPs ou Spa. Assim, em caso de inativação do *operon icaABCD*, observa-se que o potencial para formação de biofilmes se mantém, desde que a cepa seja *ica*-independente (LASA; PENADÉS, 2006; MARTÍ et al., 2010).

Diferentemente do que ocorre com a expressão dos genes *ica* para produção de polissacarídeos de adesão – cujo pico ocorre nos primeiros momentos da formação do biofilme – outros fatores de ligação, tais como fatores de aglutinação e proteínas de ligação são expressos durante a permanência do biofilme em vários momentos ao longo do tempo. Possivelmente devido a um tempo de vida mais curto desses produtos, sua síntese ininterrupta

deve exercer um papel importante para a permanência e diferenciação do biofilme em momentos posteriores à adesão e ao estabelecimento do mesmo (RESCH et al., 2005).

Pequenas mutações em genes regulatórios, como o gene acessório de regulação estafilocócico (*sarA*), são capazes de reduzir o potencial de formação de biofilmes. No entanto, a diminuição da expressão de biofilmes não é um mecanismo totalmente independente do *locus ica*. Na maioria dos casos, a supressão de determinados mecanismos regulatórios impacta negativamente a expressão de genes *ica*, o que reforça a importância desses genes para a adesão celular e o estabelecimento do biofilme em *S. aureus* (BEENKEN et al., 2004).

De qualquer maneira, é evidente que a formação do biofilme está intimamente relacionada à expressão dos genes *ica* em cepas de *S. aureus* dependentes da expressão dos polissacarídeos de adesão PSA/PIA. Para a produção de biofilme nessas cepas é imprescindível a presença e expressão do *cluster ica*, o qual compreende tanto genes responsáveis pela síntese de polissacarídeos de adesão – seja à superfície ou intercelular – representados pelo *operon icaABCD*, quanto genes responsáveis pela regulação da expressão da síntese, representados pelo gene *icaR* (ARCHER et al., 2011). Tal regulação responde positivamente a condições de anaerobiose do meio, comumente observadas no ambiente de um biofilme (CRAMTON et al., 2001).

No *operon icaABCD*, o gene *icaA*, responsável por codificar a enzima N-acetil-glucosamil-transferase, e, conseqüentemente, pela produção do polímero poli-N-acetilglucosamina (PIA), determina uma expressão relativamente baixa. Quando a expressão do gene *icaA* é concomitante à do gene *icaD*, a produção de N-acetil-glucosamil-transferase aumenta consideravelmente. Assim, a co-expressão desses dois genes dentro do *operon icaABCD* potencializa a expressão de biofilmes em *S. aureus* (GERKE et al., 1998).

Algumas vias de expressão têm sido propostas para a função do gene *icaA* na produção do polissacarídeo envolvido na produção de EPS em *S. aureus*. Atkin et al. (2014) sugeriram que a presença dos genes *icaAD* e *icaB* seria imprescindível para a produção de EPS e, diferentemente dos estudos até então realizados, uma expressão relativamente minoritária do gene *icaC* no processo de produção de biofilmes em ECP.

Segundo os referidos autores, o gene *icaA* codifica uma N-acetil-glucosamina transferase, envolvida na síntese do polímero N-acetil-glucosamina (PIA), constituído de 4 proteínas trans-membrana localizadas na região citoplasmática (Figura 6). O gene *icaD* codifica uma proteína consideravelmente menor localizada integralmente na membrana celular, compreendida por uma dupla hélice transmembrana, necessária para a plena atividade

de *icaA*. O gene *icaB* parece codificar uma N-diacetilase de PIA, e sabe-se que uma porção considerável desse polissacarídeo corresponde a uma estrutura N-diacetilada. Estudos anteriores afirmavam que o gene *icaC* estava envolvido na rota de exportação do polissacarídeo, de modo a transportá-lo para fora da célula bacteriana; no entanto, estudos recentes têm debatido essa teoria, propondo que essa função seja expressa pela porção *icaAD*; assim, o gene *icaC* não compreende um componente funcional do núcleo de sistemas de biossíntese de EPS, cabendo-lhe a função de modificar a estrutura do referido polissacarídeo (ATKIN et al., 2014).

Figura 6 – Modelo para função de *locus ica* na biossíntese do polissacarídeo PIA. Rota de exportação de PIA através dos genes *icaAD* e o-succinilação de PIA catalisada por *icaC*. Sistemas com estruturas compartilhadas em azul; componentes únicos coloridos na coração verde. Adaptado de Atkin et al., 2014

Todos os genes *ica* se expressam de maneira mais elevada em células que compõem um biofilme quando comparados com células planctônicas. A expressão máxima parece ocorrer nos estágios iniciais após a adesão, de cerca de 8 horas, diminuindo nos estágios finais. Dessa maneira, os genes envolvidos na regulação da formação de biofilmes em cepas *ica*-dependentes parecem exercer um papel fundamental principalmente nas etapas iniciais, que correspondem aos estágios de adesão célula-superfície e célula-célula (RESCH et al., 2005).

A regulação gênica da produção de biofilmes *ica*-dependentes é bastante complexa, e alguns estudos demonstraram vários fatores de regulação que interferem na sua expressão (Figura 7). A expressão do *operon icaABCD* pode ser suprimida pela produção de *TcaR* – um *locus* de transcrição regulatória – e *icaR*, resultando na diminuição da produção de PIA e da capacidade de formação de biofilme. No caso do gene *icaR*, sua expressão pode ser regulada positiva ou negativamente por reguladores denominados Spx (regulador global de resposta ao estresse celular) e Rbf (proteína regulatória da formação de biofilmes), respectivamente. Consequentemente, a indução de *icaR* pela proteína Spx resulta na supressão do *operon icaABCD*, e, consequentemente, da formação do biofilme. Rbf, por sua vez, inibe a expressão de *icaR*, levando a uma supra regulação da expressão de *icaABCD*. Adicionalmente, condições anaeróbicas induzem a produção de SrrAB (um regulador da resposta respiratória de estafilococos), resultando na expressão de *icaABCD*, produção de PIA e formação de biofilmes de *S. aureus* (ARCHER et al., 2011).

Spx: regulador global de resposta ao estresse celular; **Rbf:** proteína regulatória da formação de biofilmes; **tcaR:** regulador transcricional; **SrrAB:** regulador da resposta respiratória de estafilococos; **PIA:** Polissacarídeo de Adesão Intercelular; **Spa:** proteína de *S. aureus*; **FnBPs:** proteínas de ligação à fibronectina; **Bap:** proteína associada à biofilmes. → regulação positiva; →| regulação negativa.

Figura 7 – Fatores regulatórios envolvidos na formação de biofilmes de *S. aureus*. Adaptado de Archer et al., 2011

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a habilidade de formação de biofilmes de diferentes cepas de *S. aureus* isoladas de linhas de processamento de queijo Minas frescal e sua resistência a um processo de higienização

3.2 Objetivos específicos

- Pesquisar a presença de genes responsáveis pela produção de biofilmes em isolados de *S. aureus* provenientes de laticínios;
- Comparar a adesão bacteriana de cepas de *S. aureus* em diferentes superfícies (aço inoxidável e polipropileno), temperaturas (5 e 35°C) e tempos de contato (3, 6, 12 horas e após processo de higienização);
- Verificar a resistência dos biofilmes a um processo simulado de higienização (detergente neutro e hipoclorito de sódio).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do universo amostral

As cepas de *S. aureus* analisadas no presente estudo foram coletadas em 3 laticínios produtores de queijo Minas frescal, no período compreendido entre março de 2012 e fevereiro de 2013. O Laticínio A apresentava captação diária de 20 mil litros de leite, produção semanal de cerca de 600 kg de queijo Minas frescal (250 kg/lote). O leite era pasteurizado por High Temperature Short Time (HTST), em pasteurizador de placas, a 73°C durante 15 segundos. O Laticínio B apresentava captação diária de 800 litros de leite e produção semanal de cerca de 150 kg de queijo Minas frescal (150 kg/lote). O leite era pasteurizado em tanque a 65°C durante 30 minutos. O Laticínio C consistia em uma granja leiteira, com produção própria diária de cerca de mil litros de leite, beneficiado logo após a ordenha via pasteurização rápida. A produção semanal de queijo Minas frescal era de 400 kg, lote único.

As amostras foram provenientes de diversos pontos de amostragem da linha de processamento dos queijos – leite cru (coletado do silo), leite pasteurizado (coletado do pasteurizador), tanques de coagulação, liras, coalhada, formas de queijo, mesa de dessoragem, salmoura, piso, mãos de manipuladores, queijos não-embalados, queijos embalados e embaladeira.

4.2 Caracterização das cepas analisadas

Para amostras líquidas, foram coletados cerca de 1000 mL de volume para cada lote. Para amostras sólidas (queijos), foram coletadas 5 unidades de cada lote de produção, a partir das quais foi realizado isolamento das colônias típicas, como descrito adiante. Para amostras ambientais e de superfícies, as coletas foram realizadas com suabes estéreis umedecidos em solução salina (0,85%) com peptona (0,1%), adicionada de 0,01% de tiosulfato de sódio como neutralizante de sanificantes, em área delimitada de 5,0 cm x 10,0 cm em 2 pontos distintos, de modo a finalizar uma unidade amostral de 100 cm². Para a coleta a partir de manipuladores, foi empregada a técnica de suabe em toda a superfície da palma da mão.

Para isolamento de colônias de *Staphylococcus* spp., foram utilizadas placas contendo Baird Parker Agar (BPA-Difco®) com solução de gema de ovo e telurito de potássio (Laborclin®). A partir de cada diluição seriada, um volume de 0,1 mL foi colocado sobre a placa e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 48

horas. Até 30 colônias das placas de BPA de cada amostra que apresentaram crescimento de colônias típicas (circulares, convexas, cinzas e pretas, com halo opaco) foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI-Difco®). Após incubação por 24 h a 37°C, uma alçada de 1 µL das culturas em BHI foi esgotada por estriamento em placas contendo Agar Soja Triptona (TSA-Difco®) e incubadas a 37°C por 48 h, de modo a se obter uma colônia típica isolada na placa. Por fim, a colônia obtida pelo esgotamento foi transferida para tubos contendo caldo BHI, seguido de incubação a 37°C por 24 h. As culturas em BHI foram analisadas fenotipicamente por meio de testes de coloração de Gram, catalase, coagulase e DNase, conforme descrito no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (LANCETTE; BENNETT, 2001).

4.3 Reativação das culturas

Os isolados foram mantidos a -18°C até o momento da extração de DNA. Para as etapas seguintes, foram reativadas em caldo BHI por meio de três repicagens sucessivas com incubação a 35°C durante 24 horas.

4.4 Extração de DNA genômico (Kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”)

Para obtenção do *pellet* de células, 1,5 mL de meio de cultura inoculado conforme descrito no item 4.3 foi transferido para um microtubo com capacidade de 1,5 mL e centrifugados durante 30 segundos a 9.650 g (Mini Spin Plus Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante foi descartado. O procedimento foi repetido de modo a se obter uma quantidade considerável de concentrado de células. Os *pellets* concentrados foram submetidos à extração de DNA por meio de kit “AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep”, seguindo as recomendações do fabricante. Quinhentos microlitros de tampão AP1 foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo o *pellet* de células, seguido de agitação em vórtex durante 10 segundos, para intensificar a liberação do DNA genômico. Em seguida, foram adicionados 100 µL do tampão A2, seguido de agitação em vórtex durante 10 segundos. O volume obtido foi centrifugado a 9.650 g durante 20 minutos, para decantação dos detritos celulares. A um tubo de 2 mL foi acrescida uma coluna de AxyPrep™, dentro da qual foi despejado o sobrenadante obtido na etapa anterior, seguido de nova centrifugação a 9.650 g durante 1 minuto. Após o descarte do filtrado, foram acrescidos à coluna 700 µL do tampão W1A, a qual permaneceu em repouso à temperatura ambiente durante 2 minutos.

Seguiu-se centrifugação a 9.650 g durante 1 minuto. Após descarte do filtrado, foram transferidos para a coluna 800 µL de tampão W2, centrifugados a 9.650 g durante 1 minuto. Uma etapa opcional foi realizada descartando-se o filtrado do microtubo de 2 mL e adicionando-se 500 µL de tampão W2 na coluna, seguido de centrifugação a 9.650 g durante 1 minuto. Descartado o filtrado, foi realizada uma nova centrifugação durante 1 minuto a 9.650 g. Em seguida, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, dentro da qual adicionaram-se 100 µL de tampão TE, seguido de repouso à temperatura ambiente durante 1 minuto. O material foi novamente centrifugado a 9.650 g durante 1 minuto, a fim de se eluir o DNA genômico extraído. O material obtido foi congelado e mantido a -18°C para as reações posteriores.

A verificação do DNA extraído foi feita após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE; Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídio. A documentação do gel foi feita pelo programa “Image Lab Software” do “Molecular Imager Gel Doc™ XR” (BioRad®, Hercule, CA, EUA). Os moldes de DNA foram então congelados a -18°C para análises genotípicas posteriores.

4.5 Detecção de genes *icaA* e *icaD* envolvidos na síntese de biofilmes

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *icaA* e *icaD* descritos por Vasudevan et. al. (2003) estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes *icaA* e *icaD*

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência sentido 3'- 5'	Tamanho (pb)
<i>icaA</i>	icaAF	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315
	icaAR	AAGATATAGCGATAAGTGC	
<i>icaD</i>	icaDF	AAACGTAAGAGAGGTGG	381
	icaDR	GGCAATATGATCAAGATAC	

As reações de amplificação foram realizadas a partir de *mix* de reação contendo tampão para a reação PCR 1X, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 3 mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 1 µL

de DNA molde, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, água ultrapura esterilizada (Milli-Q, Millipore, EUA), para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador C1000 (Bio-Rad, Hércules, EUA) nas seguintes condições: 92°C/3 minutos, 30 ciclos a 92°C/45 segundos, 54,5°C/45 segundos e 72°C/1 minuto; extensão final a 72°C/7 minutos. Como controle positivo, utilizou-se a cepa *S. epidermidis* ATCC 35983, a qual expressa a produção de biofilmes. A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA 100 pb DNA Ladder (Promega®, Madison, EUA), após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE, conforme descrito anteriormente.

4.6 Ensaios de biofilmes

4.6.1 Preparo do inóculo

Para cálculo do inóculo foram obtidas, previamente, curvas de crescimento para a espécie isolada (*S. aureus*), utilizando-se cepa padrão (*S. aureus* ATCC 25923). Cem microlitros de uma cultura reativada a partir de 2 repiques sucessivos (35°C/24 horas) foram adicionados a 100 mL de caldo BHI. A cada 60 minutos foi retirada uma alíquota de 1 mL de cultura, seguida de diluição seriada em tubos com água salina peptonada e plaqueadas em triplicata em ágar TSA para contagem após 48 horas de incubação a 35°C. Foram totalizadas 11 contagens, do tempo zero (T=0) (população da cultura) até a décima hora de incubação (T=10); as contagens foram expressas em UFC.mL⁻¹.

Para preparo do inóculo a ser utilizado nos ensaios, foi retirada uma alíquota no tempo estabelecido como descrito anteriormente (3 horas de incubação), obtendo-se uma suspensão bacteriana em torno de 10⁴ UFC.mL⁻¹ de leite. Para aferição do inóculo, foi realizada contagem por plaqueamento em profundidade em TSA, incubado a 35°C/48 horas.

4.6.2 Preparo dos cupons

Cupons de aço inoxidável 304 com polimento sanitário (simulando a superfície dos equipamentos utilizados em laticínios) e de polipropileno (simulando a superfície das formas de queijo) com 12 mm de diâmetro serviram de substrato para a formação dos biofilmes. Os cupons foram previamente higienizados por imersão em solução de hidróxido de sódio 1,0% (m/v) durante 30 minutos, enxágue em água destilada, imersão em álcool 70% (v/v) e

finalmente enxágue em água destilada. Posteriormente, os cupons foram secos em estufa por 2 horas (TRAVAGIN, 2010).

4.6.3 Estudo da adesão bacteriana

A fim de simular uma situação observada nos laticínios, utilizou-se um reator de biofilmes CDC (CBR 90 Biofilm Reactor, Biosurface Corp., Montana, EUA). Esse reator é composto por 8 suportes tubulares aos quais são acoplados os cupons (3 cupons/suporte), que ficam suspensos verticalmente; o sistema de suportes é acoplado a uma tampa e permanece no interior de um jarro, por onde circulam o leite, os detergentes/sanificantes e as soluções de enxágue. Todos os componentes internos são autoclaváveis. Na base do jarro há um sistema de agitação magnética e uma placa aquecedora, cujos controles são automatizados (Figura 8). A disposição dos cupons nos suportes permite a inserção ou remoção de cupons assepticamente durante o experimento com biofilmes. Um exemplo do experimento em execução pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 8 – Reator de Biofilmes CDC

Figura 9 – Reator de Biofilmes CDC durante execução do experimento. A) Sistema composto por leite inoculado, bomba peristáltica, base agitadora e aquecedora e sistema de tubos para circulação do leite e soluções de enxágue. B) Detalhe do jarro

Todo o sistema interno do reator foi previamente esterilizado (autoclavação a 121°C/15 minutos). Os cupons permaneceram dentro do reator contendo 400 mL de leite UHT integral inoculado conforme item 4.6.1. Os cupons foram retirados em momentos distintos (3, 6 e 12 horas de incubação e após a simulação de um procedimento de limpeza e sanificação), totalizando 4 diferentes períodos. Todas as cepas estudadas para a formação de biofilmes (Tabela 3) foram submetidas às temperaturas de 5°C e 35°C e às superfícies de contato de aço inoxidável e polipropileno. Alíquotas do leite UHT integral antes da inoculação também foram incubadas, nas mesmas condições, para verificação de sua esterilidade.

Tabela 3 – Cepas utilizadas para os ensaios de biofilmes

Cepa	Origem	Local
A059	Laticínio A	Mesa
A158	Laticínio A	Lira de corte
B190	Laticínio B	Tanque
B228	Laticínio B	Manipulador
C310	Laticínio C	Leite cru
C321	Laticínio C	Leite cru
A359	Laticínio A	Lira de corte

Após incubação, os cupons submetidos ao processo de formação de biofilmes foram assepticamente retirados dos suportes e enxaguados com 10 mL de Tampão Fosfato pH 7,2, para remoção de células não aderidas. Posteriormente, foram transferidos a tubos contendo 10 mL de água salina peptonada + Tween 80 (1ª diluição) e sonicados a 20 KHz durante 1 minuto (Sonicador UltraCleaner 800A, Unique®, São Paulo, Brasil); a partir da 1ª diluição, foram retiradas alíquotas para preparo das diluições seguintes em água salina peptonada (H₂Osp). Realizou-se plaqueamento em profundidade para contagem em placas de TSA, incubadas a 35°C/48 horas. Para determinar a população bacteriana aderida à superfície dos cupons, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{UFC.cm}^{-2} = \text{UFC.mL}^{-1} \text{ da suspensão} \times \frac{\text{volume de diluente (mL)}}{\text{área amostrada (cm}^2\text{)}}$$

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise visual das superfícies de estudo e das células aderidas, os cupons foram submetidos à MEV. Nessa análise, os cupons foram lavados com tampão fosfato para remoção das células não aderidas e fixados em solução Karnovsky modificada; os cupons permaneceram nessa solução até que se realizassem os demais procedimentos. Em seguida, foi realizada lavagem com três passagens de 10 minutos em tampão cacodilato 0,05 M e desidratação com acetona em concentrações crescentes (25%, 50%, 75%, 90%, 100%) permanecendo 10 minutos em cada, e, na última concentração, por três vezes. Para retirada da acetona, foi realizada secagem ao ponto crítico de CO₂. No caso dos cupons de polipropileno, foi utilizado etanol para desidratação. Depois disso, os cupons foram montados em *stubs* (suportes), identificados e metalizados com ouro (Figura 10) (RIBEIRO-FURTINI, 2005; SANTOS, 2009). Após este procedimento, as amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS DSM 940 A, do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA-ESALQ/USP). As imagens foram capturadas com baixa magnitude para visualização das superfícies de estudo, e alta magnitude, para visualização de detalhes e células bacterianas aderidas.

Figura 10 – Preparo dos cupons para análise por MEV. A) Câmara de secagem ao ponto crítico de CO₂; B) Metalização dos cupons com ouro. C) Cupons metalizados prontos para análise

4.7 Avaliação da eficiência do processo de limpeza e sanificação sobre as células aderidas

Os cupons de aço inoxidável e de polietileno foram submetidos à simulação de um processo de limpeza e higienização no último período de cada ensaio (após 12 horas de incubação). Toda etapa foi realizada no reator de biofilmes, com controle automatizado da temperatura dos agentes de limpeza e soluções de enxágue e do tempo de contato. Os detergentes e sanificantes, preparados conforme orientações do fabricante, foram: detergente neutro a 3,5% (v/v) e sanificante à base de hipoclorito de sódio a 1000 mg.L⁻¹. As concentrações escolhidas levaram em consideração informações obtidas em um dos laticínios estudados, visando à uma simulação mais próxima do observado na prática. Para preparo das soluções, foi utilizada água destilada estéril. O protocolo testado pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4 – Protocolo do processo simulado de limpeza e sanificação

Etapa	Detergentes/solução de enxágue	Temp. (°C)	Concentração	Tempo (min)
1	água destilada estéril	25	-	5
2	detergente neutro	25	3,5% (v/v)	5
3	água destilada estéril	25	-	5
4	hipoclorito de sódio	25	1000 mg.L ⁻¹	15

O número de UFC.cm⁻² de *S. aureus* sobre a superfície de todos os cupons, antes e depois da simulação do processo de limpeza e higienização, foi quantificado conforme descrito no item 4.6.3. Os cupons para análise por MEV foram retirados depois do processo simulado de limpeza e higienização, enxaguados com tampão fosfato, fixados em solução Karnovsky modificada e mantidos sob refrigeração para posterior tratamento e análise microscópica (item 4.6.4).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 2 x 2 – quatro tempos (3, 6, 12 horas e após processo simulado de limpeza e sanificação), duas superfícies (aço inoxidável e polipropileno) e duas temperaturas (5 e 35°C), em duplicata e 2 repetições. As médias das contagens de micro-organismos foram comparadas através do Teste de Tukey-Kramer. As análises foram conduzidas através do software SAS® 2002 (Statistical Analysis Software®, Cary, EUA), sendo considerado um nível mínimo de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação de fragmentos de genes produtores de biofilmes

Dos 100 isolados de *S. aureus* provenientes dos três laticínios estudados, foi possível detectar a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 74,0% e 77,0%, respectivamente. Esses genes estiveram presentes em 70,0% dos isolados. A ausência de ambos os genes foi observada em apenas 19,0% dos isolados. As imagens dos géis de eletroforese para algumas amostras com os produtos de amplificação para os genes *icaA* e *icaD* estão representadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11 – Gel de agarose 1,0% contendo 10 µL de produtos de PCR a partir do DNA genômico dos isolados de *S. aureus* identificados, indicando a presença do gene *icaA*. Canaletas M: Padrão molecular 100 pb (Promega®); A: *S. epidermidis* ATCC 35983 (controle positivo); B: isolado A54; C: isolado A61; D: isolado A62; E: isolado A76; F: isolado A117; G: isolado A118; H: isolado A157; I: isolado B227; J: isolado B233; K: isolado B235; L: isolado B243; M: isolado B249; N: Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

Figura 12 – Gel de agarose 1,0% contendo 10 µL de produtos de PCR a partir do DNA genômico dos isolados de *S. aureus* identificados, indicando a presença do gene *icaD*. Canaletas M: Padrão molecular 100 pb (Promega®); A: *S. epidermidis* ATCC 35983 (controle positivo); B: isolado A62; C: isolado A68; D: isolado A76; E: isolado A77; F: isolado A104; G: isolado A117; H: isolado A57; I: isolado A157; J: isolado B240; K: isolado B277; L: isolado B284; M: isolado B286; N: Controle negativo (reação de PCR sem DNA)

No Laticínio A foi encontrada a maior prevalência de isolados com ambos os genes (83,9%, N=56), como demonstrado na Figura 13. Sua ocorrência em amostras de leite, utensílios e mãos de manipuladores indica a ampla disseminação do patógeno potencialmente formador de biofilmes por todo o laticínio e é apresentada na Tabela 5.

Figura 13 – Isolados de *S. aureus* portadores dos genes codificadores da proteína relacionada com a produção de biofilmes (*icaA* e *icaD*) coletados de 3 laticínios

A matéria-prima (leite cru refrigerado) consiste em uma das fontes de introdução de *S. aureus* formadores de biofilmes no ambiente de processamentos de queijos, além dos manipuladores, que apresentaram a bactéria nas mãos. A ocorrência de cepas nos utensílios e superfícies de equipamentos confirmam a ampla disseminação do patógeno dentro do laticínio. Dessa maneira, a recontaminação da matéria-prima mesmo após o processo de pasteurização contribui para a má qualidade microbiológica dos queijos.

Tabela 5 – Caracterização dos isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes pontos dos laticínios A, B e C (as letras que antecedem os números correspondem ao laticínio de origem)

(*Continua*)

Isolado	Origem	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
A052	Leite cru refrigerado	+	+
A054	Leite cru refrigerado	-	-
A057	Tanque de queijo	-	-
A059	Mesa	+	+
A061	Mãos (manipulador)	+	+
A062	Mãos (manipulador)	+	+
A065	Queijo pré-embalagem	+	+
A068	Queijo pré-embalagem	+	+
A070	Queijo embalado	+	+
A076	Queijo embalado	+	+
A077	Queijo embalado	+	+
A104	Leite cru refrigerado	+	+
A117	Mãos (manipulador)	+	+
A118	Mãos (manipulador)	+	+
A147	Leite cru refrigerado	+	+
A149	Leite cru refrigerado	+	+
A150	Leite cru refrigerado	+	+
A151	Leite cru refrigerado	+	+
A157	Leite cru refrigerado	+	+
A158	Lira de corte	+	+
A159	Leite cru refrigerado	+	+
A160	Leite cru refrigerado	+	+
A163	Leite cru refrigerado	+	+
A164	Leite cru refrigerado	+	+
A166	Leite cru refrigerado	+	+
A167	Leite cru refrigerado	+	+
A168	Leite cru refrigerado	+	+
A169	Leite cru refrigerado	+	+
A170	Leite cru refrigerado	+	+
A350	Leite cru refrigerado	+	-
A352	Leite cru refrigerado	+	+
A353	Leite cru refrigerado	+	+
A354	Leite cru refrigerado	+	+

Tabela 5 – Caracterização dos isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes pontos dos laticínios A, B e C (as letras que antecedem os números correspondem ao laticínio de origem)

(Continuação)

Isolado	Origem	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
A355	Leite cru refrigerado	+	+
A356	Leite cru refrigerado	-	+
A359	Lira de corte	+	+
A361	Lira de corte	+	+
A362	Lira de corte	+	+
A363	Lira de corte	+	+
A364	Mãos (manipulador)	+	+
A365	Mãos (manipulador)	+	+
A366	Mãos (manipulador)	+	+
A367	Mãos (manipulador)	+	+
A368	Salmoura	-	+
A381	Queijo embalado	-	-
A383	Leite cru refrigerado	-	-
A384	Leite cru refrigerado	+	+
A385	Leite cru refrigerado	+	+
A386	Leite cru refrigerado	+	+
A387	Leite cru refrigerado	+	+
A388	Leite cru refrigerado	+	+
A389	Leite cru refrigerado	+	+
A390	Leite cru refrigerado	+	+
A391	Leite cru refrigerado	-	+
A392	Leite pasteurizado	-	+
A406	Queijo embalado	+	+
B190	Tanque de queijo	+	+
B191	Mesa	-	-
B196	Mãos (manipulador)	-	-
B198	Mãos (manipulador)	-	-
B204	Mãos (manipulador)	-	-
B207	Queijo pré-embalagem	-	-
B218	Queijo embalado	+	+
B227	Leite cru refrigerado	-	-
B228	Mãos (manipulador)	+	+
B229	Piso	-	-
B233	Queijo embalado	-	+
B235	Queijo embalado	+	-
B236	Queijo embalado	-	-
B240	Leite cru refrigerado	+	+
B243	Leite cru refrigerado	+	-
B247	Leite pasteurizado	+	+
B249	Mesa	-	+
B251	Mãos (manipulador)	-	-
B254	Queijo pré-embalagem	-	-
B256	Queijo pré-embalagem	-	+
B267	Queijo embalado	+	+

Tabela 5 – Caracterização dos isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes pontos dos laticínios A, B e C (as letras que antecedem os números correspondem ao laticínio de origem)

Isolado	Origem	(Conclusão)	
		<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
B277	Leite cru refrigerado	+	+
B284	Leite cru refrigerado	+	+
B286	Tanque de queijo	+	-
B289	Queijo pré-embalagem	+	+
B290	Queijo pré-embalagem	+	+
B296	Queijo embalado	+	+
B297	Queijo embalado	+	+
B298	Queijo embalado	-	-
C300	Leite cru refrigerado	+	+
C303	Leite cru refrigerado	+	+
C305	Leite cru refrigerado	+	+
C307	Leite cru refrigerado	+	+
C308	Leite cru refrigerado	+	+
C310	Leite cru refrigerado	+	+
C312	Leite cru refrigerado	+	+
C313	Leite cru refrigerado	+	+
C315	Coágulo	-	-
C316	Leite cru refrigerado	+	+
C317	Leite cru refrigerado	+	+
C321	Leite cru refrigerado	+	+
C327	Leite pasteurizado	-	-
C329	Tanque de queijo	-	-
C334	Mesa	-	-

(+) positivo: presença do gene; (-) negativo: ausência do gene

A ocorrência de *S. aureus* nas superfícies de equipamentos e utensílios, como lira de corte e mesa de dessoragem de queijos, indica falhas nos procedimentos de higienização. Como será discutido mais adiante, nesse laticínio era utilizado um detergente neutro, quando em geral recomenda-se a utilização de um detergente ácido para remoção de incrustações e depósitos de minerais, e/ou alcalino para remoção de compostos orgânicos presentes em abundância em resíduos de leite. O não atendimento às práticas de higiene adequadas dentro do ambiente de processamento dos queijos, aliado ao fato dos isolados apresentarem genes para formação de biofilmes, contribui para a permanência da bactéria no Laticínio A, bem como sua ocorrência no produto final.

Além de potencialmente produtores de biofilmes, muitos isolados portadores dos genes *icaA* e *icaD* identificados no presente estudo são também portadores de genes para produção de enterotoxinas, conforme detectado por Silva (2013). Trata-se de um problema de grande

preocupação em termos de Saúde Pública, uma vez que a presença de cepas nesse ambiente com potencial para expressar diferentes mecanismos de patogenicidade pode trazer sérios riscos à saúde do consumidor, principalmente por terem sido detectadas também nos queijos embalados, prontos para o consumo.

A detecção dos genes *icaA* e *icaD* na maioria dos isolados revela seu potencial de produção de biofilmes no laticínio. Na presença isolada de *icaA* (detectado em apenas 4% dos isolados para os 3 laticínios), ocorre reduzida expressão de biofilmes, uma vez que esse gene codifica a enzima responsável pela produção do polissacarídeo PIA, em pequenas quantidades. No entanto, com a presença simultânea de *icaD*, ocorre considerável aumento de sua expressão, potencializando a formação de biofilmes de *S. aureus* (GERKE et al, 1998).

No laticínio B, 41,38% (N=29) dos isolados apresentaram ambos os genes. Nesse laticínio, 37,93% dos isolados não apresentaram nenhum dos genes para formação de biofilmes, maior índice de isolados *ica*-negativos dentre os laticínios avaliados. Apesar dessa prevalência ser menor quando comparada com o laticínio anterior, a ocorrência de isolados produtores de biofilmes no interior do laticínio expõe os consumidores ao risco de desenvolver uma DTA.

A detecção de isolados *ica*-positivos em leite cru refrigerado, piso, mãos de manipulador, mesa de dessoragem e tanque de coagulação sugere uma ampla distribuição de *S. aureus* potencialmente produtores de biofilmes em todo o ambiente de produção. Sua ocorrência em leite pasteurizado, da mesma maneira que foi observada no Laticínio A, sugere falhas no processo de pasteurização do leite – único ponto do processo que poderia reduzir eventuais contaminações microbiológicas na matéria-prima. Problemas no equipamento, em sua higienização ou até mesmo o não atendimento ao binômio tempo *versus* temperatura podem ser os responsáveis pela ineficiência da pasteurização. A existência de um biofilme consolidado no pasteurizador poderia comprometer toda a produção subsequente, trazendo prejuízos ao produtor, bem como riscos à saúde dos consumidores dos queijos ali produzidos.

O isolamento de *S. aureus* *ica*-positivos no tanque de coagulação contribui para o agravamento da situação. Uma vez que o leite fica diretamente em contato com a superfície do tanque, o risco de disseminação de *S. aureus* aderidos às paredes do mesmo nesse ponto do processo é considerável. Soma-se a isso o longo período de contato entre a matéria-prima e a superfície, pois o tempo decorrido entre a adição dos ingredientes, a coagulação da massa, o corte da coalhada e a enformagem geralmente é superior a 1 hora. Assim, expõe-se o produto a um foco de contaminação de *S. aureus* por um longo período de tempo e a uma temperatura compreendida entre 36 e 40°C, faixa considerada ótima para sua multiplicação.

Concomitantemente, as cepas isoladas nesse laticínio apresentaram também genes para produção de enterotoxinas, conforme relatado por Silva (2013). Uma vez que a produção de biofilmes é considerada um importante fator de virulência de *S. aureus*, a ocorrência de outros fatores em conjunto pode aumentar os riscos de sua veiculação como fonte de DTA entre consumidores de queijo Minas frescal.

De uma maneira geral, a maior parte dos isolados (70,0%) apresentou potencial para formar biofilmes, uma vez que apresentaram, em conjunto, os principais genes envolvidos com o processo de adesão celular de *S. aureus*, *icaA* e *icaD*. A presença desses genes foi comprovada por meio da detecção dos produtos dos genes por PCR e a presença dos mesmos pode estar relacionada à capacidade de adesão e formação de biofilmes em algumas das cepas estudadas.

Devido ao grande número de isolados portadores de ambos os genes *icaA* e *icaD*, foram selecionadas, dentre os 70 isolados *icaAD*+, 7 cepas de interesse para os ensaios de biofilmes. Priorizaram-se, nessa etapa, as cepas isoladas de superfícies de equipamentos, como tanque de coagulação, mesas e liras.

5.2 Ensaios de biofilmes

A cepa A059 foi isolada de um laticínio com produção expressiva (20 mil litros de leite/dia, produção semanal de 600 kg de queijo Minas frescal, 250 kg/lote) (SILVA, 2013), a partir da mesa de dessoragem. As maiores contagens de células aderidas foram observadas a 35°C em aço inoxidável após 12 horas de contato (Tabela 6).

Tabela 6 – Contagens bacterianas (Cepa A059) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA A059 (Mesa)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,67 ± 0,04	3,39 ± 0,18 ^{BAA}	5,67 ± 0,02 ^{AAA}	6,16 ± 0,04 ^{AAA}	4,19 ± 0,12 ^{(AB)AA}
35°C PP	3,76 ± 0,05	2,80 ± 0,11 ^{BAA}	5,15 ± 0,03 ^{AAA}	5,56 ± 0,04 ^{AAA}	4,14 ± 0,01 ^{(AB)AA}
5°C Inox	4,51 ± 0,01	3,43 ± 0,07 ^{ABB}	3,40 ± 0,12 ^{ABB}	3,88 ± 0,03 ^{ABB}	2,15 ± 0,02 ^{BBB}
5°C PP	4,28 ± 0,01	5,05 ± 0,04 ^{AAB}	5,02 ± 0,06 ^{AAB}	5,23 ± 0,06 ^{AAB}	ND ^{BAB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanitização; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

As diferenças de adesão entre as superfícies a 35°C não foram significativas ($p < 0,05$), ou seja, não houve influência da superfície na adesão bacteriana. Estudo de Luppens et al. (2002) verificou que os materiais avaliados – vidro, aço inoxidável e poliestireno – não influenciaram na adesão bacteriana de *S. aureus*. Outros estudos indicam, no entanto, uma maior disposição de biofilmes de *S. aureus* se estabelecerem em aço inoxidável a 25°C, quando comparada à superfície de polipropileno. No entanto, os resultados podem variar em função do substrato de crescimento do biofilme e das condições de estudo empregadas (OULAHAL et al., 2008).

Do período de 3 horas até 12 horas de incubação, a contagem de ECP aumentou de 3,39 $\log_{10}$ para 6,16 $\log_{10}$ UFC.cm⁻², o que representa um aumento de, aproximadamente, 600 vezes no número de células aderidas por cm² de superfície. Assim, em um período de tempo relativamente curto a população bacteriana aderida pode atingir níveis elevados e comprometer todo o lote de queijo produzido. Nas primeiras horas de contato, o número de células aderidas pode aumentar consideravelmente, favorecendo, por conseguinte, a formação de um biofilme bacteriano no local.

Para a temperatura de 5°C, observou-se um padrão diferente: contagens superiores e com diferenças significativas para a superfície de polipropileno. Esse material favoreceu uma maior adesão de células bacterianas nas primeiras horas de contato. Durante o processo de enformagem, os queijos são mantidos nas respectivas fôrmas até que se façam os procedimentos de viragem para posterior salga. No decorrer de todo esse período, que pode chegar a 2 horas, os queijos são mantidos diretamente em contato com as formas, aumentando o risco de contaminação nessa etapa do processamento.

Ao longo do tempo não houve crescimento expressivo da população aderida a 5°C para ambas as superfícies avaliadas, quando comparado ao aumento observado a 35°C, o que se deve ao fato de *S. aureus* ser um micro-organismo mesófilo, cuja temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa dos 40°C.

Em determinadas condições a adesão bacteriana de *S. aureus* em superfícies inertes é expressiva em um primeiro momento; no decorrer do tempo, no entanto, o número de células aderidas parece não crescer significativamente, o que pode estar relacionado ao processo de divisão celular ou à redistribuição de células aderidas que constituirão o biofilme maduro (MEIRA et al., 2012).

De qualquer maneira, a superfície de polipropileno mostrou ser um melhor material para a fixação dessa cepa a 5°C, com maiores riscos de contaminação dos queijos, uma vez que, ainda enformados, são mantidos sobre a mesa de dessoragem, o que possibilita a

contaminação cruzada através das fôrmas. Como estas são constituídas de polipropileno, favorecem a adesão bacteriana, propiciando uma condição favorável à formação de biofilmes nesse material, o que é agravado pelo fato dos queijos enformados serem mantidos à temperatura de refrigeração durante todo o processo de viragem, em uma condição semelhante à simulada nesse experimento.

Em relação ao processo simulado de limpeza e sanificação, observa-se claramente que esse foi mais eficiente na temperatura de 5°C, principalmente para a superfície de polipropileno (Figura 14). Nessa condição, houve uma redução de mais de 5 ciclos logarítmicos nas contagens da população bacteriana aderida após 12 horas, mediante a aplicação dos agentes de limpeza e sanificação. Essa maior eficiência pode estar relacionada ao fato de que à 5°C ocorre a ativação de genes relacionados à manutenção metabólica em baixas temperaturas, situação de estresse para um micro-organismo mesófilo como *S. aureus*. Trata-se, pois, de um resultado significativo, demonstrando que o hipoclorito de sódio (1.000 mg.L⁻¹) foi eficiente na remoção dos biofilmes, sob tais condições e para a cepa em questão. Em relação à superfície de aço inoxidável, no entanto, a redução do número de *S. aureus* aderidos por meio do processo de higienização, apesar de significativa, não se demonstrou satisfatória.

Figura 14 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A059) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada

A 35°C – temperatura ótima de crescimento de *S. aureus* – o processo simulado de limpeza demonstrou-se ainda mais deficiente; apesar da significativa redução numérica superior a 1 ciclo logaritmo para ambas as superfícies, em termos práticos a permanência de uma população superior a 4 log₁₀ UFC.cm⁻² de superfície sanificada é preocupante.

Segundo Silva Jr. (2002), recomenda-se uma tolerância de até 5,0 x 10 UFC.cm⁻² de mesófilos aeróbios aderidos a superfícies que entrem em contato com alimentos após a aplicação de um processo de higienização, número classificado como “regular” pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Assim, as contagens de *S. aureus* observadas para essa cepa, para ambas as superfícies a 35°C e para o aço inoxidável a 5°C se apresentaram muito superiores aos padrões recomendados.

Para a cepa A158, proveniente do mesmo laticínio e isolada de lira de corte, as maiores contagens de células aderidas foram observadas a 35°C em aço inoxidável após 12 horas de contato (Tabela 7).

Tabela 7 – Contagens bacterianas (Cepa A158) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados (log₁₀ UFC.cm⁻²)

CEPA A158 (Lira)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,59 ± 0,12	4,05 ± 0,37 ^{CAA}	5,33 ± 0,23 ^{BAA}	5,77 ± 0,07 ^{AAA}	4,11 ± 0,27 ^{CAA}
35°C PP	4,83 ± 0,06	4,36 ± 0,48 ^{CAA}	5,18 ± 0,10 ^{BAA}	5,73 ± 0,09 ^{AAA}	4,35 ± 0,15 ^{CAA}
5°C Inox	4,55 ± 0,06	2,76 ± 0,13 ^{AAB}	3,29 ± 0,16 ^{AAB}	3,34 ± 0,16 ^{AAB}	ND ^{BAB}
5°C PP	4,63 ± 0,04	3,03 ± 0,04 ^{AAB}	3,07 ± 0,12 ^{AAB}	3,24 ± 0,09 ^{AAB}	ND ^{BAB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: após processo simulado de sanificação; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer (p < 0,05) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

As diferenças de adesão entre temperaturas iguais não foram significativas (p < 0,05), ou seja, não houve influência das superfícies na adesão bacteriana, apenas influência da temperatura. O processo de adesão bacteriana ocorreu de maneira mais acentuada a 35°C, temperatura ideal para a multiplicação do *S. aureus*. A adesão bacteriana máxima geralmente é observada em temperaturas próximas ao ótimo de crescimento, independente de características como espécie ou superfície de contato (MORTON et al., 1998).

A lira de corte entra em contato direto com a coalhada em um momento em que a massa de queijo se encontra em uma temperatura próxima ao ótimo de crescimento de *S. aureus* (40°C). Dessa maneira, a lira contaminada se configura como um instrumento de inserção de estafilococos na massa de queijo, com consequente multiplicação bacteriana e possibilidade de produção de enterotoxinas.

Em relação ao processo simulado de limpeza e sanificação, observa-se que foi mais eficiente na temperatura de 5°C, para ambas as superfícies avaliadas (Figura 15). Após a aplicação do protocolo, houve uma redução de mais de 3 ciclos logarítmicos nas contagens da população bacteriana aderida após 12 horas, comprovando a eficácia do detergente e do sanificante na remoção das células aderidas. Entretanto, a 35°C o processo não foi eficiente para reduzir as contagens a níveis seguros.

Figura 15 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A158) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada

A ineficiência do sanificante deve estar relacionada à melhor adaptação de *S. aureus* na temperatura de 35°C, bem como em função da população ser superior à observada na temperatura de 5°C. Além disso, alguns sanificantes podem ter sua ação reduzida ou até mesmo inibida na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, que podem ser visualizados nas microfotografias mostradas adiante (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; BRIDIER et al., 2011).

A Figura 16 foi obtida de cupom de aço inoxidável incubado em leite inoculado com a cepa A158 a 35°C durante 12 horas. Sobre a superfície podem ser observadas estruturas depositadas, possivelmente material lácteo, como cristais de cálcio ou aglomerados proteicos aderidos à superfície. Esses depósitos de matéria orgânica ou mineral podem favorecer a formação de biofilmes, à medida que potencializam a adesão bacteriana nesses locais (BREMER; FILLARY; MCQUILLAN, 2006).

Figura 16 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de aço inoxidável incubados a 35°C (Cepa A158). A) Irregularidades na superfície de aço inoxidável; B e C) estruturas depositadas sobre a superfície; D) Coco de *S. aureus* aderido à superfície do cupom

Na Figura 16.D pode ser observado um único coco de *S. aureus* aderido à superfície. Foram encontradas apenas células isoladas, sem arranjos característicos da espécie, como cachos de uva, o que pode estar relacionado ao arranjo diferenciado que essas células

adquirem em suspensão (como no leite inoculado, por exemplo); arranjos característicos de estafilococos são comumente observados em culturas crescidas sobre ágar de crescimento.

A Figura 17 apresenta uma lira de corte do Laticínio A antes de ser utilizada na produção de queijo muçarela. Apesar de não corresponder à lira de origem da cepa A158, a observação desse tipo de situação demonstra as más condições de higiene em que se encontravam alguns utensílios, com massas de queijo ressecadas e aderidas firmemente à superfície. Uma condição dessas favorece a multiplicação bacteriana, a adesão celular e a formação de biofilmes de *S. aureus*.

Figura 17 – Lira de corte do Laticínio A com massas de queijo ressecadas e aderidas aos fios

Além dos problemas observados com a lira de corte, condições de higiene insatisfatórias no tanque de leite utilizado para produção do queijo Minas frescal também puderam ser verificadas. Nas paredes laterais internas do tanque havia resíduos de massa de queijo fortemente aderidos à superfície de aço inoxidável (Figura 18).

Figura 18 – Tanque de coagulação de queijo com resíduos aderidos à parede interna, observado no Laticínio A

Para a cepa A359, proveniente do mesmo laticínio e isolada de lira de corte, a partir de uma segunda coleta realizada no local, as maiores contagens de células aderidas foram observadas a 35°C em aço inoxidável após 12 horas de contato (Tabela 8), da mesma maneira que para a temperatura de 5°C.

Tabela 8 – Contagens bacterianas (Cepa A359) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA A359 (Lira)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,59 ± 0,02	3,57 ± 0,02 ^{CAA}	5,26 ± 0,08 ^{BAA}	6,30 ± 0,09 ^{AAA}	4,33 ± 0,04 ^{CAA}
35°C PP	5,39 ± 0,04	2,75 ± 0,03 ^{CBA}	5,21 ± 0,05 ^{BBA}	6,14 ± 0,01 ^{ABA}	2,54 ± 0,07 ^{CBA}
5°C Inox	5,59 ± 0,06	2,42 ± 0,10 ^{BAB}	2,38 ± 0,12 ^{(AB)AB}	2,77 ± 0,08 ^{AAB}	ND ^{CAB}
5°C PP	4,16 ± 0,02	1,65 ± 0,29 ^{BBB}	1,95 ± 0,14 ^{(AB)BB}	2,39 ± 0,05 ^{ABB}	ND ^{CBB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanificação; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

Houve diferença significativa para a variável temperatura, sendo que a de 35°C favoreceu uma maior adesão de células bacterianas, quando comparada com a temperatura de 5°C. Para ambas as temperaturas, também houve influência da superfície na adesão, com a superfície de aço inoxidável favorecendo significativamente a adesão dessa cepa.

Para a superfície de aço inoxidável, as contagens diferiram significativamente no decorrer do tempo entre as temperaturas de 5°C e 35°C. Nessa última, foi observado um maior número de células de *S. aureus* aderidas. No período compreendido entre 3 horas e 12 horas de incubação, a contagem aumentou de 3,57 log₁₀ para 6,30 log₁₀ UFC.cm⁻² no cupom com a cepa proveniente da lira de corte. A 5°C, as populações aderidas a ambas superfícies também diferiram significativamente ao longo do tempo, porém, com um aumento relativamente discreto.

No que diz respeito ao processo simulado de higienização, este não foi eficaz na eliminação das células aderidas na temperatura de 35°C (Figura 19). Tanto para o aço inoxidável quanto para o polipropileno, após a higienização foram detectadas contagens de células aderidas da ordem de 4,33 e 2,54 log₁₀ UFC.cm⁻², respectivamente, valores bem distantes do recomendado. Células aderidas demonstraram ser mais facilmente removidas da superfície de polipropileno a 35°C, mediante a aplicação dos detergentes e sanificantes, com diferença significativa em relação ao aço inoxidável.

Figura 19 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa A359) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanitizado. ND: contagem não detectada

Em relação à temperatura de 5°C, o processo de higienização empregado mostrou-se eficaz, com redução das células aderidas da ordem de 2,39 e 2,77 log₁₀ UFC.cm⁻² para

polipropileno e aço inoxidável, respectivamente. Ao final do processo, não foram detectadas contagens.

Na Figura 20 notam-se irregularidades nas superfícies, as quais favorecem a adesão bacteriana e, conseqüentemente, a formação de biofilmes. Nas seções 20.E e 20.F podem ser visualizadas células alocadas em diferentes nichos: à esquerda, uma célula presa a uma estrutura plástica que compõe o cupom; à direita, uma célula presa a cristais, com estruturas dispostas lateralmente em sua superfície.

Em laticínios, pontos críticos como cantos, válvulas e juntas podem acumular resíduos de leite, favorecendo o acúmulo de componentes orgânicos e adesão bacteriana, seguida do estabelecimento de um biofilme. Assim, procedimentos adequados de higienização, com o uso correto de sanificantes, bem como o respeito ao seu tempo de ação, são imprescindíveis para evitar a problemática de biofilmes no ambiente de processamento de alimentos. O uso adequado de enzimas e outros detergentes – e não apenas ácidos ou alcalinos – é altamente recomendado (DAT et al., 2012).

Nesse laticínio, para limpeza das superfícies e equipamentos era utilizado um detergente neutro. Detergentes alcalinos, mais adequados para remoção de resíduos de carboidratos, gordura e proteína, em conjunto detergentes ácidos, próprios para remoção de resíduos minerais, são mais indicados para limpeza de plantas de processamento de lácteos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Além disso, as formas de queijo, os agitadores e as liras de corte não ficavam totalmente submersos na solução sanificante. Logo, a ação do hipoclorito de sódio ficava restrita apenas às regiões submersas, contribuindo para a permanência de um biofilme de *S. aureus* nesses utensílios.

Os resultados aqui demonstrados mostram a ineficiência dos procedimentos de limpeza e sanificação na remoção de células de *S. aureus* aderidas. Alterar, pois, o protocolo de higienização utilizado no laticínio com vistas a aumentar a segurança microbiológica dos queijos ali produzidos é medida corretiva imprescindível.

Figura 20 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de polipropileno incubados a 35°C (Cepa A359). A) 3 horas de incubação; B) 6 horas de incubação; C) e D) 12 horas de incubação; E) e F) Após processo simulado de limpeza e sanificação

A próxima cepa avaliada, B190, foi isolada de um tanque de coagulação de um laticínio pequeno, com captação diária de aproximadamente 800 litros de leite e produção semanal de queijo Minas frescal de 150 kg, em lotes de 50 kg. A pasteurização do leite era lenta, a 65°C durante 30 minutos. Para essa cepa, as maiores contagens de células aderidas foram observadas na temperatura de 35°C (Tabela 9), sem diferença significativa entre as superfícies, nessa temperatura.

Tabela 9 – Contagens bacterianas (Cepa B190) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA B190 (Tanque)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,81 ± 0,07	3,36 ± 0,12 ^{CAA}	5,20 ± 0,07 ^{BAA}	5,48 ± 0,04 ^{AAA}	4,42 ± 0,04 ^{CAA}
35°C PP	4,64 ± 0,02	4,27 ± 0,50 ^{CAA}	4,84 ± 0,02 ^{BAA}	5,98 ± 0,02 ^{AAA}	3,69 ± 0,01 ^{CAA}
5°C Inox	4,61 ± 0,01	2,04 ± 0,10 ^{ABB}	1,97 ± 0,05 ^{ABB}	1,95 ± 0,10 ^{ABB}	ND ^{BBB}
5°C PP	4,63 ± 0,02	2,10 ± 0,10 ^{AAB}	2,47 ± 0,08 ^{AAB}	2,72 ± 0,06 ^{AAB}	ND ^{BBB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanificação; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

Assim, tanto para aço inoxidável quanto para polipropileno, a temperatura de 35°C favoreceu significativamente a adesão de *S. aureus*. Do momento em que o leite pasteurizado chega ao tanque de coagulação até a etapa de enformagem dos queijos são transcorridos cerca de 90 minutos. Durante esse tempo, biofilmes de *S. aureus* presentes no tanque podem disseminar o patógeno para a coalhada, contribuindo para o comprometimento de todo o lote.

Além disso, no tanque de coagulação do leite, a redução do pH do meio, seja pela fermentação biológica ou pela adição de ácido láctico pode aumentar a ocorrência de incrustações, devido, principalmente, à coagulação do leite, a qual promove a solubilização do fosfato de cálcio e a precipitação da caseína. Além desses componentes, outras proteínas presentes no leite, como α -lactoglobulina e α -lactoalbumina também são capazes de se aderir à superfície, fornecendo nutrientes e condições ideais para a multiplicação bacteriana nas paredes do tanque de coagulação (DAT et al., 2012).

Santos (2009) encontrou *S. aureus* produtores de biofilmes em tanques de recepção e estocagem de leite, pasteurizador e máquina de envase de leite em uma micro-usina de

beneficiamento de leite do Estado de São Paulo. Além da ocorrência de cepas portadoras dos genes *icaA* e *icaD* naquelas superfícies, testes *in vitro* confirmaram a capacidade de formação de biofilmes em superfícies de aço inoxidável.

Lee et al. (2014) detectaram um elevado percentual (41,9%) de cepas de *S. aureus* produtoras de biofilmes em superfície de tanque de expansão de leite em ambiente de ordenha em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. Segundo os autores, os dados representam um grave problema de Saúde Pública, relacionado principalmente à persistência de estafilococos produtores de biofilmes, em diversos pontos do ambiente de ordenha provenientes de vacas com mastite, e ressaltam, ainda, a necessidade de práticas higiênicas adequadas a fim de se prevenir a formação de biofilmes nesse tipo de estabelecimento.

Em relação ao processo de higienização, para a temperatura de 5°C, o detergente empregado e o hipoclorito de sódio mostraram-se eficazes na eliminação das bactérias aderidas (Figura 21). Após a simulação do processo, não foram detectadas células aderidas na amostragem realizada para ambas as superfícies, com redução significativa de até cerca de 3 $\log_{10}$ UFC.cm⁻².

Figura 21 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa B190) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada

Em relação à temperatura de 35°C, mais uma vez o processo de higienização empregado não foi eficaz na remoção das células aderidas. Para a superfície de polipropileno, houve redução de cerca de $2 \log_{10}$ UFC.cm⁻²; para o aço inoxidável, a redução foi menor: cerca de $1 \log_{10}$ UFC.cm⁻². No entanto, as contagens bacterianas das células aderidas para as superfícies de polipropileno e aço inoxidável foram de 3,69 e 4,42 $\log_{10}$ UFC.cm⁻², respectivamente, números bastante superiores aos recomendados.

O hipoclorito de sódio pode ter sua atividade reduzida em até 600 vezes na remoção de biofilmes de *S. aureus* (LUPPENS et al., 2002). Vázquez-Sánchez et al. (2014) relatam a necessidade de altas concentrações de hipoclorito de sódio na total remoção de biofilmes de *S. aureus* de aço inoxidável (18.000 mg.L⁻¹), número bastante superior ao recomendado para uso na indústria de alimentos, que variam entre 50 e 800 mg.L⁻¹ (GAULIN et al., 2011).

Os resultados encontrados para a cepa B190, isolada de tanque de leite, sugerem especial atenção, uma vez que toda a matéria-prima utilizada na produção dos queijos é mantida dentro do tanque por um período de tempo relativamente longo. O tanque se caracteriza, dessa forma, como um ponto importante de disseminação de *S. aureus* dentro do laticínio, tendo em vista que utensílios, formas, mesas e todo o lote produzido estará suscetível à contaminação por eventuais biofilmes de *S. aureus* ali estabelecidos.

A cepa B228, isolada do mesmo laticínio de mãos de manipuladores, apresentou maior adesão na temperatura de 35°C e na superfície de polipropileno, com diferença significativa para ambas as variáveis (Tabela 10).

Tabela 10 – Contagens bacterianas (Cepa B228) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA B228 (Mãos)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,73 ± 0,02	3,41 ± 0,09 ^{BBA}	5,29 ± 0,11 ^{ABA}	5,45 ± 0,17 ^{ABA}	1,89 ± 0,17 ^{BBA}
35°C PP	4,74 ± 0,20	3,73 ± 0,02 ^{BAA}	5,01 ± 0,01 ^{AAA}	5,73 ± 0,46 ^{AAA}	4,21 ± 0,55 ^{BAA}
5°C Inox	4,54 ± 0,04	1,99 ± 0,06 ^{ABB}	1,99 ± 0,13 ^{ABB}	2,12 ± 0,06 ^{ABB}	ND ^{BBB}
5°C PP	4,27 ± 0,05	2,10 ± 0,04 ^{AAB}	2,16 ± 0,09 ^{AAB}	3,03 ± 0,55 ^{AAB}	ND ^{BAB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanificação; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

Diferentemente do observado nos outros casos, a superfície de polipropileno se mostrou favorável à adesão bacteriana em ambas as temperaturas avaliadas. O isolamento dessa cepa em mãos de manipuladores de queijos indica problemas de higiene pessoal, constituindo, assim, em uma fonte de disseminação do patógeno dentro do laticínio. Os funcionários não faziam uso de luvas, favorecendo, dessa maneira, a contaminação das formas e utensílios utilizados no processamento dos queijos.

Lee et al. (2014) também isolaram cepas de *S. aureus* produtoras de biofilmes de mãos de manipuladores de fazendas leiteiras do Estado de São Paulo. As cepas analisadas foram capazes de se aderirem a superfícies de aço inoxidável. Os autores reforçam a necessidade do emprego de práticas de higiene adequadas a fim de se evitar a formação e disseminação de biofilmes de *S. aureus* em laticínios.

Em relação ao processo simulado de limpeza e sanificação, as condições avaliadas na temperatura de 5°C foram satisfatórias na remoção das células aderidas, com expressivas reduções ao final do processo (contagem não detectada) (Figura 22). As populações removidas foram da ordem de 2 e 3 log₁₀ UFC.cm⁻² para as superfícies de aço inoxidável e polipropileno, respectivamente.

Figura 22 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa B228) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada

Seguindo o mesmo padrão observado para as outras cepas, a 35°C o processo de higienização não foi eficiente na remoção das células aderidas. Para a superfície de aço inoxidável, houve redução significativa de células aderidas de cerca de $4 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$ após a sanificação; no entanto, a população que se manteve aderida à superfície estudada foi de $1,89 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$. Para a superfície de polipropileno, a adesão observada, mesmo após o processo de sanificação, foi ainda maior, de $4,21 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$. Dessa maneira, a cepa B228 demonstrou ser menos suscetível à ação dos agentes de limpeza e sanificação empregados na superfície de polipropileno, na temperatura de 35°C.

Nessas condições, foram observadas, por meio da análise das microfotografias obtidas por MEV, as células aderidas nas várias etapas de estudo. A Figura 23 apresenta cupons de polipropileno incubados a 35°C em diferentes estágios. Além de ser possível observar irregularidades das superfícies, com depósitos de minerais, são visualizadas células aderidas nos cupons após 3, 6 e 12 horas de incubação, bem como após o processo de sanificação. As imagens reforçam os resultados apontados anteriormente, com células bacterianas íntegras após a aplicação de agentes de limpeza e sanificante à base de hipoclorito de sódio.

Figura 23 – Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupons de polipropileno incubados a 35°C (Cepa B228). A) 3 horas de incubação; B) 6 horas de incubação; C) e D) 12 horas de incubação; E) e F) Após processo simulado de limpeza e sanificação

A Figura 24 apresenta um cupom de polipropileno incubado a 35°C com 12 horas de contato, condição em que foram detectadas as maiores contagens bacterianas para a cepa B228. Observam-se claramente irregularidades e imperfeições na superfície estudada, com elevações e materiais depositados. Em meio a essas condições, pode-se visualizar também uma grande quantidade de cocos de *S. aureus* aderidos, o que provavelmente indica o estabelecimento de uma comunidade bacteriana potencialmente formadora de biofilme nessa região.

Figura 24 – Microfotografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de cupom de polipropileno incubado a 35°C (Cepa B228) com 12 horas de incubação

Apesar de tais evidências, convém ressaltar que a quantidade de células necessárias para produção considerável de EPS da matriz do biofilme de *S. aureus* parece ser relativamente superior, ao redor de $8 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$. Contagens menores podem indicar apenas um processo de adesão, e não o estabelecimento de um biofilme maduro propriamente dito, o que, por sua vez, demandaria a ocorrência de um período de tempo maior, que pode variar de 24 horas a 3 dias (OLIVEIRA et al., 2007; MEIRA et al., 2012).

A cepa C310 foi isolada de um laticínio com características de granja leiteira (produção própria de 1000 litros de leite/dia, produção semanal de 400 kg de queijo Minas frescal, em um único lote) (SILVA, 2013), a partir de leite cru. As maiores contagens de células aderidas foram observadas em polipropileno a 35°C, após 12 horas de contato (Tabela 11).

Tabela 11 – Contagens bacterianas (Cepa C310) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA C310 (Leite cru)		Períodos			
Condições	Inoculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,91 ± 0,01	3,42 ± 0,04 ^{CBA}	4,69 ± 0,02 ^{B(AB)A}	5,15 ± 0,03 ^{AAA}	4,52 ± 0,03 ^{(BC)BA}
35°C PP	4,70 ± 0,02	3,14 ± 0,02 ^{CCA}	4,80 ± 0,07 ^{BBA}	5,84 ± 0,02 ^{AAA}	3,83 ± 0,06 ^{(BC)(BC)A}
5°C Inox	4,92 ± 0,01	2,10 ± 0,07 ^{BBB}	2,10 ± 0,04 ^{B(AB)B}	2,17 ± 0,03 ^{AAB}	ND ^{BBB}
5°C PP	4,95 ± 0,01	3,57 ± 0,02 ^{BCB}	3,60 ± 0,02 ^{BBB}	4,98 ± 0,04 ^{AAB}	3,50 ± 0,02 ^{B(BC)B}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanificação; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos dentro de temperaturas, dentro de superfícies e apenas entre superfícies, respectivamente.

O número de células aderidas aumentou ao longo do tempo para todas as condições analisadas. Como observado nos outros casos, na temperatura de 35°C a adesão aumentou de maneira mais acentuada no decorrer das análises, em relação à temperatura de 5°C, por estar mais próxima do ótimo de crescimento da espécie. Nessa condição, foi observado aumento de cerca de 2 $\log_{10}$ UFC.cm⁻² para ambas as superfícies avaliadas, transcorridas 9 horas de contato após a primeira contagem.

À 5°C, houve adesão considerável para ambas as superfícies, com crescimento discreto do número de células aderidas no decorrer do tempo. A superfície de polipropileno permitiu uma maior adesão, com acréscimo considerável quando comparados o primeiro e o terceiro períodos de análise.

De uma maneira geral, portanto, as maiores taxas de adesão foram observadas para a temperatura de 35°C e para a superfície de polipropileno, com diferenças significativas ($p < 0,05$). Nessas condições, foi observada, após 12 horas de contato, adesão bacteriana próxima a 6 $\log_{10}$ UFC.cm⁻². Meira et al. (2012) relatam uma maior taxa de adesão por *S.*

aureus em polipropileno a 28°C em relação a outras condições avaliadas (como superfície de aço inoxidável e temperatura de 7°C), resultado condizente com o encontrado nesse trabalho para a cepa C310. No entanto, os autores afirmam não ser clara a correlação entre o tipo de superfície e a temperatura de incubação na adesão de *S. aureus*, uma vez que os resultados foram divergentes para outras cepas analisadas.

Em relação à eficiência do processo de higienização empregado, o mesmo mostrou-se eficaz apenas na condição de temperatura de 5°C e superfície de aço inoxidável. O método foi capaz de remover, portanto, as células aderidas apenas na condição em que apresentou a menor taxa de adesão (Figura 25). Para a superfície de polipropileno, nessa temperatura houve discreta remoção das células aderidas após o emprego do detergente e sanificante; no entanto, ao final do processo, o número de células que se mantiveram fixadas sobre a superfície foi de 3,5 $\log_{10}$ UFC.cm⁻².

Figura 25 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa C310) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada.

Na temperatura de 35°C, na qual houve maior adesão, o processo promoveu uma remoção relativamente baixa, possibilitando a manutenção de populações bacterianas aderidas da ordem de 4 $\log_{10}$ UFC.cm⁻², números muito superiores aos recomendados para superfícies que entrem em contato com alimentos após higienização.

Estudos comparativos acerca da eficiência de diferentes sanificantes na remoção de biofilmes de *S. aureus* demonstram que o hipoclorito de sódio raramente se encontra entre os mais adequados. Vázquez-Sánchez et al. (2014) avaliaram a eficiência de três sanificantes na remoção de *S. aureus* de aço inoxidável. Ácido peracético foi o mais eficiente, seguido de hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio. Os autores afirmam, no entanto, que as doses recomendadas para a remoção completa do biofilme mostraram-se muito superiores às recomendadas pelos respectivos fabricantes.

Furukawa et al. (2010) avaliaram a ação de diferentes agentes de limpeza utilizados em processos CIP (detergentes, surfactantes e quelantes) na remoção de *S. aureus* e *E. coli* de aço inoxidável. Os autores relatam que para a remoção efetiva dos biofilmes apenas os compostos em altas concentrações mostraram-se eficazes, especificamente os agentes fortemente ácidos e/ou alcalinos. Biofilmes de *S. aureus* apresentaram-se mais resistentes que os de *E. coli*, nas situações avaliadas.

Para a cepa C321, isolada do mesmo laticínio, as maiores contagens de células aderidas foram observadas a 35°C, em polipropileno com 12 horas de contato (Tabela 12). A 5°C foi observada maior contagem em aço inoxidável no período de 12 horas, com diferença significativa entre as superfícies avaliadas.

Tabela 12 – Contagens bacterianas (Cepa C321) em diferentes temperaturas, superfícies e tempos de contato avaliados ($\log_{10}$ UFC.cm⁻²)

CEPA C321 (Leite cru)		Períodos			
Condições	Inóculo	3 horas	6 horas	12 horas	Sanificado
35°C Inox	4,24 ± 0,04	2,93 ± 0,10 ^{BBA}	2,93 ± 0,10 ^{BBA}	5,51 ± 0,08 ^{ABA}	3,40 ± 0,07 ^{BBA}
35°C PP	4,56 ± 0,04	4,30 ± 0,11 ^{BAA}	4,73 ± 0,06 ^{BAA}	6,58 ± 0,03 ^{AAA}	4,21 ± 0,05 ^{BAA}
5°C Inox	4,62 ± 0,01	2,74 ± 0,10 ^{BBB}	2,99 ± 0,13 ^{(AB)BB}	3,17 ± 0,11 ^{ABB}	ND ^{CBB}
5°C PP	4,57 ± 0,03	2,74 ± 0,10 ^{BAB}	2,82 ± 0,13 ^{(AB)AB}	3,04 ± 0,07 ^{AAB}	ND ^{CAB}

Inox: cupom de aço inoxidável; PP: cupom de polipropileno; Sanificado: período após processo simulado de sanitização; ND: não detectado. Letras diferentes implicam diferença significativa pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre os tempos, superfícies e temperaturas, respectivamente.

De modo geral, a temperatura de 35°C favoreceu significativamente a adesão bacteriana, o que foi observado para a maioria das cepas avaliadas no presente estudo. Nessa

temperatura, a superfície de polipropileno permitiu uma adesão significativamente maior, o que já pôde ser observado no primeiro período de análise. No decorrer do tempo, foi observado aumento significativo no número de células aderidas para ambas as superfícies, com destaque para o polipropileno, que permitiu um aumento superior a $2 \log_{10}$ UFC.cm⁻² no número de células aderidas, transcorridas 9 horas de incubação.

O polipropileno demonstrou ser mais favorável à adesão também na temperatura de 5°C, embora as contagens nessa condição fossem menores em relação à temperatura de 35°C, correspondendo à cerca de metade do número encontrado após 12 horas de contato. Os resultados confirmam a tendência de uma menor adesão em temperaturas mais baixas, observada para a maioria das cepas analisadas. No decorrer do tempo, nota-se um discreto aumento na adesão bacteriana; dessa maneira, o número de células que conseguem se aderir em um primeiro momento de contato parece ser determinante para o número final de células aderidas mesmo após exposição por períodos de tempos mais prolongados.

Alguns estudos sugerem uma expressão acentuada dos genes *ica* nos momentos iniciais da formação do biofilme, principalmente na etapa de fixação da bactéria à superfície, imprescindível para a produção suficiente de polissacarídeos de adesão celular. O aumento do nível de expressão nos estágios iniciais relaciona-se ao processo de fixação, sendo imprescindível para que esse ocorra; posteriormente, ocorre diminuição da expressão, uma vez que as células já se encontram aderidas, e as condições do meio, como esgotamento de nutrientes, podem influenciar negativamente a expressão da produção de polissacarídeos de adesão (RESCH et al. 2005).

Em relação à atuação dos agentes de limpeza e sanificação sobre as células aderidas, o processo demonstrou ser eficiente apenas na temperatura de 5°C, como na maioria dos casos analisados (Figura 26). O processo de higienização foi capaz de remover de ambas as superfícies cerca de $2 \log_{10}$ UFC.cm⁻²; na temperatura de 35°C, no entanto, o número de células aderidas em polipropileno e aço inoxidável foi reduzido em cerca de 2 e 0,6 $\log_{10}$ UFC.cm⁻², respectivamente. Contudo, as contagens finais para ambas as superfícies ficaram em torno de $4 \log_{10}$ UFC.cm⁻², número bastante superior ao recomendado para superfícies higienizadas.

Figura 26 – Contagens bacterianas dos biofilmes (Cepa C321) em diferentes condições. Temperaturas de incubação: 5°C e 35°C; superfícies de contato: aço inoxidável (Inox) e polipropileno (PP); e períodos de incubação: 3, 6, 12 horas e sanificado. ND: contagem não detectada.

Meira et al. (2012) compararam a eficácia de dois sanificantes, ácido peracético e hipoclorito de sódio, na remoção de biofilmes de *S. aureus* de aço inoxidável e polipropileno. Nas concentrações avaliadas, tanto o ácido peracético (30 mg.L⁻¹) quanto o hipoclorito de sódio (250 mg.L⁻¹) não foram capazes de remover completamente as células aderidas de ambas as superfícies. Os resultados aqui apresentados mostram-se ainda mais preocupantes, uma vez que a concentração de hipoclorito testada (1.000 mg.L⁻¹) foi 4 vezes superior à avaliada pelos referidos autores.

Problemas de higienização nos silos de leite cru, origem da cepa C321, podem favorecer sua permanência no ambiente do laticínio, contribuindo para a disseminação do patógeno para a matéria-prima. Apesar do leite cru ser submetido ao processo de pasteurização para produção dos queijos, a permanência de uma cepa produtora de biofilmes no silo onde é armazenada toda matéria-prima constitui um grande risco à produção, na medida que se caracterizaria como uma fonte permanente de contaminação do leite. Soma-se a isso o fato da referida cepa ser produtora de enterotoxina tipo G (SILVA, 2013), acarretando em sérias implicações, uma vez que o processo de pasteurização não é capaz de degradar toxinas pré-formadas, que permanecem no produto final.

6 CONCLUSÕES

Nos laticínios avaliados foi detectada alta prevalência de *S. aureus* potencialmente formadores de biofilmes, com genes específicos para a produção de polissacarídeos de adesão celular e de EPS constituintes da matriz de biofilmes.

As cepas escolhidas para os ensaios de biofilmes mostraram-se capazes de se aderir às superfícies avaliadas de maneira significativa, revelando grande potencial para o desenvolvimento e estabelecimento de biofilmes nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados em laticínios.

Para a maioria das cepas, a temperatura de 35°C demonstrou influenciar positivamente a adesão de *S. aureus* em ambas as superfícies avaliadas.

A 5°C, células de *S. aureus* foram capazes de se aderir às superfícies avaliadas, mas em quantidades significativamente inferiores às observadas para a temperatura de 35°C.

O protocolo para limpeza e sanificação avaliado não foi eficiente na remoção de células de *S. aureus* aderidas, tanto para a superfície de aço inoxidável quanto para a de polipropileno, a 35°C.

Torna-se imprescindível uma revisão das práticas de higiene empregadas nos laticínios, principalmente no que diz respeito aos procedimentos de limpeza e sanificação, a fim de se evitar a formação de biofilmes na planta de processamento de queijos e consequentes riscos à saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology**. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 479p.
- ALFIERI, A.A. Gestão profilática das principais doenças infecto-contagiosas em bovinos leiteiros. In: SANTOS, G. T.; UHLIG, L.; BRANCO, A.F.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C.; CECATO, U. (Ed.). **Bovinocultura de leite - inovação tecnológica e sustentabilidade**. Maringá: Eduem, 2008. p. 131-152.
- ALMEIDA FILHO, E.S.D.; NADER FILHO, A. Occurrence of fecal coliforms and *Escherichia coli* in samples of homemade cheese sold in a city of Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 71-73, 2002.
- ANDRADE, A.P.C.; BORGES, M.F.; FIGUEIREDO, E.A.T.; MACHADO, T.F.; PORTO, B.C. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Fortaleza, v. 52, p. 18, 2011.
- ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.D.O.; LIMA, J.C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N.J. (Ed.). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. p.15-66.
- ARCHER, N.K.; MAZAITIS, M.J.; COSTERTON, W.; LEID, J.G.; POWERS, M.E.; SHIRTLIFF, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms - Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, Vienna, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ATKIN, K.E.; MACDONALD, K.E.S.J.; BRENTNALL, A.S.; POTTS, J.R.; THOMAS, G.H. A different path: Revealing the function of staphylococcal proteins in biofilm formation: **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 588, p. 1869-1872, 2014.
- BEENKEN, K.E.; DUNMAN, P.M.; MCALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, n. 14, p. 4665-4684, 2004.
- BORGES, M.D.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil – 1999 a 2009**. Disponível de: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em: 22 dez. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – Abril 2013. Disponível em: <http://www.camara.leg.br>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, Chur, v. 27, p. 1017-1032, 2011.

CÂMARA, S.A.V.; AMARAL, G.B.C.; VIANA, S.Q.; MULLER, M.T.; SILVEIRA, K.C.S.; ALMEIDA, T.N.; MEDEIRO, C.F. Microbiological evaluation of fresh handmade Minas cheese commercialized at Municipal Market in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2003.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 499-511, 1993.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHOKR, A.; WATIER, D.; ELEAUME, H.; PANGON, B.; GHNASSIA, J.-C.; MACK, D.; JABBOURI, S. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 296, p. 381-388, 2006.

COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; SOARES, L.C.; PRIBUL, B.R.; SOUZA, M.M.S. *Short communication*: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, p. 3305-3310, 2011.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711-45, 1995.

COSTERTON, J.W. **The biofilm primer**. Berlin: Springer, 2007. 199p.

CRAMTON, S.E.; ULRICH, M.; GOTZ, F.; DORING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, p. 4079-4085, 2001.

DAT, N.M.; HAMANAKA, D.; TANAKA, F.; UCHINO, T. Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stainless steel. **Food Control**, Guildford, v. 23, p. 215-220, 2012.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. **Food Antimicrobials - An Introduction**. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). *Antimicrobials in Food*. 3. Boca Ranton: CRC Press, 2005. p.1-10.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 114-122, 2003.

DAVIES, R.; BRESLIN, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. **Veterinary Record**, London, v. 152, p. 283-287, 2003.

DEQUEIROZ, G. **A new brand spectrum disinfectant suitable for the food industry**. 2004. 165p. Tese (Doutorado em Filosofia) – Universidade do Estado da Luisiana, Baton Rouge, 2004.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Disease Journal**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, London, v. 58, n. 1, p. 19-24, 2005.

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Coleção Alemã de Micro-organismos e Cultura de Células. Disponível em <http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Staphylococcus&show_all_details=1>. Acesso em: 9 nov. 2014.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 60, p. 469-472, 2010.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 376-380, 2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 23, p. 162-165, 2003.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clinical and Microbiology Infection**, Malden, v. 11, p. 967-973, 2005.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J.; GRIEBE, T.; MAYER, C. Physico-chemical properties of biofilms. In: EVANS, L.V. (Ed.). **Biofilms**: recent advantages in their study and control. Amsterdam: Taylor & Francis e-Library, 2005. chap. 2, p. 19-34.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food production and food processing: report of a joint FAO/WHO expert meeting, Ann Arbor, MI, USA, 27–30 May 2008. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598941_eng.pdf. Acesso em: 12 mar. 2014.

FRANCO, B.G.D.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FROLUND, B.; PALMGREN, R.; KEIDING, K.; NIELSEN, P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. **Water Research**, New York, v. 30, p. 1749-1758, 1996.

FURUKAWA, S.; AKIYOSHI, Y.; KOMOTIYA, M.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 5, p. 669-672, 2010.

GAULIN, C.; LÊ, M-L.; SHUM, M.; FONG, D. Disinfectants and sanitizers for use on food-contact surfaces. National Collaborative Centre for Environment Health. 2011. Disponível em: http://www.ncceh.ca/sites/default/files/Food_Contact_Surface_Sanitizers_Aug_2011.pdf. Acesso em: 20 jul. 2014.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 273, p. 18586-18593, 1998.

GILLASPY, A.; IANDOLO, J. *Staphylococcus*. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2009. p. 293-303.

GROSS, M.; CRAMTON, S.E.; GOTZ, F.; PESCHEL, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 69, p. 3423-3426, 2001.

HAMMER, B.K.; BASSLER, B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 101-104, 2003.

HENNIG, S.; NYUNT WAI, S.; ZIEBUHR, W. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate: **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 297, p. 117-122, 2007.

HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOURY, A.; BRIANDET, R.; AYMERICH, S.; GOHAR, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. In: (Ed.). **Microbiology**, England, v. 156, p. 1009-1018, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 367-372, 2001.

KAPLAN, J.B.; VELLIYAGOUNDER, K.; RAGUNATH, C.; ROHDE, H.; MACK, D.; KNOBLOCH, J.K.; RAMASUBBU, N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 8213-8220, 2004.

KOMATSU, R.S.; RODRIGUES, M.A.M.; LORENO, W.B.N.; SANTOS, K.A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, 1998.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 702-709, 2005.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, RW. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. p. 387-403.

LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation: **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, p. 99-107, 2006.

LEE, S.H.I.; MANGOLIN, B.L.C.; GOLÇALVES, J.L.; NEEFF, D.V.; SILVA, M.P.; CRUZ, A.G.; OLIVEIRA, C.A.F. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 97, p. 1812-1816, 2014.

LEE, S.H.I. **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em abiente de ordenha**. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2012.

LIU, Y.Q.; LIU, Y.; TAY, J.H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 2, p. 143-148, 2004.

LONGHI, C.; SCOARUGHI, G.L.; POGGIALI, F.; CELLINI, A.; CARPENTIERI, A.; SEGANTI, L.; PUCCI, P.; AMORESANO, A.; COCCONCELLI, P.S.; ARTINI, M.; COSTERTON, J.W.; SELAN, L. Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 45, n. 1, p. 45-52, 2008.

LUPPENS, S.B.; REIJ, M.W.; HEIJDEN, R.W.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4194-4200, 2002.

MAILLARD, J.Y. Bacterial target sites for biocide action: **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92 Suppl, p. 16s-27s, 2002.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L.; ALENCAR, T.A.; PRIBUL, B.R.; COELHO, S.M.O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E.B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 33, n. 2, p. 160-170, 2013.

MARTÍ, M.; TROTONDA, M.P.; TORMO-MÁS, M.A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; CHEUNG, A.L.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*: **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, p. 55-64, 2010.

MARTINS, E.S.; REIS, N.E.V Determination of coliforms and coagulase positive *Staphylococcus* in Minas frescal cheese. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 6, n. 2, p. 842-851, 2012.

MATHUR, T.; SINGHAL, S.; KHAN, S.; UPADHYAY, D.; FATMA, T.; RATTAN, A.; Adverse Effect of Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides. Japanese **Journal of Infectious Disease**, Toyama, v. 58, p. 353-357, 2005.

MCLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, New Brunswick, v. 1, n. 2, p. 94-114, 2006.

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, 2012.

MEIRA, Q.G.S.; BARBOSA, I.M.; ATHAYDE, A.J.A.A.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; SOUZA, E.L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 469-475, 2012.

MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, p. 2760-2764, 1998.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 2458-2461, 2007.

MORTON, L.H.G.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARDE, C.C.; SURMAN, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration**, Birmingham, v. 41, p. 247-259, 1998.

NOTERMANS, S.; DORMANS, J.A.N.A.; MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, Chur, v. 5, p. 21-36, 1991.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 187-191, 2007.

OLIVEIRA, L.P.; BARROS, L.S.S.; SILVA, V.C.; CIRQUEIRA. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. **Journal of Food Processing and Technology**, Los Angeles, n. 2, v. 6, p. 2-5, 2011.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

_____. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, n. 390, v. 68, p. 65-73, 2013.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Guildford, v. 19, p. 178-185.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 30-35, 2012.

PASSOS, A.D.; FERREIRA, G.K.L.; JULIANI, G.L.; SANTANA, E.H.W.; ARAGON-ALEGRO, L.C. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina - PR. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 369, n. 64, p. 48-54, 2009.

PINTO, F.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A.C. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

POÇAS, M.D.F.; PINTADO, M. Packaging and the Shelf Life of Cheese. In: ROBERTSON, G. L. (Ed.). **Food Packaging and Shelf Life – A Practical Guide**. Boca Raton: CRC Press, 2009. cap. 6, p. 103-125.

PRODUCE SAFETY PROJECT. Health-related costs from foodborne illness in the United States. Disponível em: <http://www.producesafetyproject.org>. Acesso em: 30 abr. 2014.

RESCH, A.; ROSENSTEIN, R.; NERZ, C.; GOTZ, F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions: **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2663-2676, 2005.

RIBEIRO-FURTINI, L.L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2005.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.M.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, Guildford, v. 28, p. 1711-1720, 2007.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, S.S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal-SP, 2009.

SÃO PAULO (ESTADO). Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde – CVS. Portaria nº 6 de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial do Estado**, 10 mar. 1999.

SÃO PAULO (ESTADO). Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE. Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados – 2000-2012. Informe NET: Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 12 fev. 2014.

SAUER, K.; RICKARD, H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SCHAUDINN, C.; STOODLEY, P.; KAINOVIC, A.; O'KEEFFE, T.; COSTERTON, B.; ROBINSON, D.; BAUM, M.; EHRLICH, G.; WEBSTER, P. Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 5, p. 231-237, 2007.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. **Queijos Nacionais. Estudo de Mercado; SEBRAE/ESPM.** 2008. Disponível em: [http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/\\$File/NT0003909E.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/$File/NT0003909E.pdf). Acesso em: 20 set. 2013.

SILVA, G.O. **Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no Estado de São Paulo.** 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVA JR., E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos.** São Paulo: Varela, 2002. 397p.

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

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy study of stainless-steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, Chicago, v. 39, p. 110-114, 1985.

SUNTHARALINGAM, P.; CVITKOVITCH, D.G. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation: **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 3-6, 2005.

SUTHERLAND, I.W. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 9, p. 1911-1917, 1997.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

TAN, Y.-E.; CHEW, S.C.; TAN, S. Y.-Y.; GIVSKOV, M.; YANG, L. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 26, p. 1-6, 2014.

TANG, X.; FLINT, S.H.; BENNETT, R.J.; BROOKS, J.D. The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 352, n. 1/2, p. 71-75, 2010.

TRAVAGIN, B.N.F.S. **Estudo da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios.** 2010. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2010.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 179-85, 2003.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M.L.; IBUSQUIZA, P.S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J.J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, Guildford, v. 39, p. 8-16.

VISVALINGAM, J.; HOLLEY, R.A. Adherence of cold-adapted *Escherichia coli* O157:H7 to stainless steel and glass surfaces. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 575-579, 2013.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 319-46, 2005.

YOU, Y.; XUE, T.; CAO, L.; ZHAO, L.; SUN, H. SUN, B. *Staphylococcus aureus* glucose-induced biofilm accessory proteins, GbaAB, influence biofilm formation in a PIA-dependent manner. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 304, n. 5/6, p. 603-612, 2014.

YU, D.L.; ZHAO, T.; XUE, T.; SUN, B. L. Zhao, T. Xue, and B. Sun, 2012, *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner. **BMC Microbiol**, London, v. 12, p. 288, 2012.

ZOCHE, F.; BASTOS, C.P.; BASSANI, M.T.; FRANÇA, R.C.; LIMA, A.S.; SILVA, W.P. *Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas frescal e Minas padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul*. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 119-124, 2012.