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

Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil

Melina Luz Mary Cruzado Bravo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

Melina Luz Mary Cruzado Bravo
Engenheira Agroindustrial

Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof^a Dr^a. **GILMA LUCAZECHI STURION**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

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

Cruzado Bravo, Melina Luz Mary

Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil / Melina Luz Mary Cruzado Bravo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Agar vermelho congo 2. MSCRAMM 3. Superfícies 4. MEV I. Título

CDD 614.31
C957e

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

DEDICATÓRIA

A mis padres, que sacándome del campo me dieron grandes oportunidades, porque sé que su arduo trabajo valió la pena.

A mis hermanitas Vanessa y Jheny que siempre me apoyan en todo, y con ellas aprendo que con esfuerzo se consigue lo que se desea.

A mi sobrinita Alexa, ya lo dije antes y lo repito, tu llegada en la casa fue como una salvación, diste alegría a nuestra familia querida Alachin.

Al hombrecito de la casa, Antonio, te esperamos con mucho cariño todos pequeñin.

A Yoni, por su cariño y compañía en la distancia.

AGRADECIMENTOS

A Dios por su infinito amor y por regalarme la vida.

A mi gran amigo “Ericki”, que me animo a seguir estudiando, por toda la ayuda de comienzo a fin.

A la Prof. Carmen, por su apoyo, comprensión y tolerancia, porque me brindo una de las mejores oportunidades en mi vida.

Al profesor Ernani Porto, que me acogió y contribuyo infinitamente en mi crecimiento profesional, que Dios lo tenga en su infinita gloria.

A la profesora Gilma, por darme la oportunidad, por su apoyo en todo.

A Nathália, porque me dio la oportunidad de aprender, me dijo que con los errores se aprendía mejor, siempre tuve suerte o mejor dicho una gran profesional a mi lado, te debo mucho querida Na!

A la Sra. Denise Leme, por sus ánimos, por su apoyo, el maravilloso café, las “caronas”, por alimentarnos siempre.

A Marjory, mi profesora de Portugués, una gran profesional, con ella me di cuenta que hay otra persona aparte de mi padre que odia los feriados, porque aprendí mucho a tu lado querida Ma, gracias por la oportunidad, también por presentarme a Mary, que nos endulza la vida con todos esos espectaculares “cupcakes”.

A mis queridísimos amigos Dario, Carmencita, Yemi, Claudio, Rafael, Meliza, Carlos, Sebastian que son una familia más, porque compartíamos mucho juntos, con ellos cerca todo fue más fácil.

A Julia e Claudia, por su apoyo en la parte experimental, que hicieron posible llegar hasta acá.

A Silvana, porque su apoyo fue crucial en la tormenta de escribir.

A Giovana, por su apoyo, sus enseñanzas, por darme las fuerzas de seguir trabajando.

A Clarice porque sigo aprendiendo de quesos contigo, por su apoyo en todo.

A mis amigos Brasileños Bruno, Guilherme, por los conciertos maravillosos por hacerme reír con sus frases en español.

A las chicas de la casa: Gleice, Laiz, Loana e Jaqueline, por acogerme.

Al programa de becas e crédito educativo (PRONABEC)- Gobierno del Perú.

Y a todos los que en este momento no mencione, pero hicieron posible este trabajo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 JUSTIFICATIVA	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
3.2 Formação do biofilme.....	22
3.3 Genes relacionados à produção de biofilme.....	26
3.4 Adesinas.....	27
3.5 Biofilmes em laticínios.....	28
3.6 Métodos para detecção de biofilme.....	30
3.6.1 Agar Vermelho congo.....	31
4 OBJETIVOS.....	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 Origem das cepas e identificação.....	36
5.2 Estudo Fenotípico	36
5.2.1 Agar vermelho congo (AVC)	36
5.3 Estudo Genotípico	37
5.3.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA).....	37
5.3.2 Perfil genotípico de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (ECP) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (ECN) formadores de biofilmes.....	37
5.4 Seleção das cepas para quantificação de biofilmes.....	41
5.5 Quantificação da produção de biofilme pelo método da microplaca.....	41
5.5.1 Preparo dos cupons	41
5.5.2 Preparo do inóculo	42
5.5.3 Lavagem, coloração e leitura da densidade óptica	42
5.5.4 Contagem de células aderidas pela técnica da micro-gota	43
5.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	43

5.7 Análise Estatística.....	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
6.1 Caraterização Fenotípica.....	47
6.2 Caraterização Genotípica.....	49
6.2.1 Resultados da avaliação genotípica da presença de genes para formação de biofilme pela metodologia da PCR.....	49
6.2.2 Frequência relativa da presença de genes e de isolados positivos no AVC.....	52
6.2.3 Perfis genotípicos dos isolados.....	56
6.3 Seleção de cepas utilizadas na quantificação de biofilmes.....	58
6.4 Quantificação do biofilme	60
6.4.1 Densidade óptica	62
6.4.2 Contagem microbiológica pela metodologia da micro-gota.....	68
6.5 Morfologia dos biofilmes pela MEV.....	73
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICES	99

RESUMO

Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp. formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil

A formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos pode resultar em contaminação em qualquer parte do processo produtivo, podendo assim, ser causa de doenças transmitidas por alimentos. A formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. é uma das grandes preocupações na indústria de lácteos, e também na área da medicina veterinária. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilmes de *Staphylococcus* spp. isolados de laticínios produtores de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite subclínica. O estudo foi realizado em 3 fases, sendo a primeira uma caracterização fenotípica de 150 isolados de *Staphylococcus* spp. pelo teste do Ágar Vermelho Congo (AVC). Na segunda fase, foi realizada uma caracterização genotípica dos isolados de *Staphylococcus* spp., pesquisando os genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* e *clfB*. Na terceira fase foram selecionadas 10 cepas com diferentes perfis genotípicos e três cepas padrão de *Staphylococcus* spp., para avaliação da capacidade de formação de biofilmes. Foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes das 13 cepas em três tempos (12h, 48h e 96h), duas temperaturas (5°C e 25°C) e duas superfícies de contato (aço inoxidável 304 e polipropileno) tendo como primeira variável resposta a densidade óptica a 600 nm obtida utilizando metodologia do cristal violeta e a segunda variável resposta foi a contagem microbiológica de células viáveis ($\log_{10}$ UFC cm^{-2}) aderidas nas superfícies testadas. Foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com fatorial de 13x3x2x2. No AVC 38,7% (n=58) dos 150 isolados foram positivos para formação de biofilme. Observou-se que 93,3% (n=140) dos 150 isolados possuíam o gene *clfA*, 87,3% (n=131) o *eno*, 62,7% (n=94) o *ebpS*, 54,7% (n=82) o *fib*, 54% (n=81) o *fnbA*, 53,3% (n=80) o *icaD*, 47,3% (n=71) os genes *icaA* e *clfB*, 43,3% (n=65) o *fnbB*, 17,3% (n=26) o *bap*, 8% (n=8) o *cna* e 4% (n=40) o gene *bbp*. Pelo Teste de Friedman ($\alpha=0,05$) os fatores cepa, temperatura e superfície foram significativos ($p<0,0001$) para as duas variáveis resposta na formação de biofilmes, enquanto que, entre os tempos de avaliação não houve diferença significativa ($p>0,05$). A maior produção de biofilme (avaliada por densidade óptica) foi observada a 25°C no aço inoxidável, sendo que as cepas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. aureus* 119 foram as cepas que apresentaram maior formação de biofilme. Nas superfícies testadas foram observadas contagens microbiológicas na faixa entre 6,5 e 7,6 $\log_{10}$ UFC m^{-2} que sugerem formação de biofilme. Foram selecionadas 6 cepas para realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as quais confirmaram a formação de biofilme em aço inoxidável e polipropileno em 5°C e 25°C sendo avaliadas á 12 e 96 horas.

Palavras-chave: Agar vermelho congo; MSCRAMM; Superfícies; MEV

ABSTRACT

Genotypic and phenotypic study of *Staphylococcus* spp. biofilm formers isolated in Frescal Minas cheese production lines and cows with mastitis in São Paulo, Brazil

The biofilm formation on surfaces, which are contact with food, can result in contamination in any part of the food processing, causing foodborne illness. The biofilm formation by *Staphylococcus* spp. is one of the main concern in the dairy industry, and in the veterinary medicine field. This research aimed to evaluate the biofilm formation capacity of *Staphylococcus* spp., isolated from dairy producers of “Minas Frescal” cheese and cows with subclinical mastitis. The study was conducted in three stages, being the first a phenotypic characterization of 150 *Staphylococcus* spp. strains using the Congo Red Agar (AVC) test. In the second stage, the genotypic characterization with the screening of the gens *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB* was performed. In the third stage, 10 strains with different genotypic profiles and 3 standard strains of *Staphylococcus* spp. were selected to evaluate the biofilm formation capacity. The biofilm formation capacity of 13 strains at three times (12h, 48h and 96h), two temperatures (5 °C and 25 °C) and two contact surfaces (stainless steel 304 and polypropylene) was evaluated. As a result, the optical density at 600 nm obtained by the methodology of crystal violet and the microbiological count of viable cells ($\log_{10}$ UFC cm^{-2}) (adhered to the tested surfaces) was analyzed. A completely randomized design was used in a factorial 13x3x2x2. In AVC agar, 38.7% (n = 58) of the 150 isolates were positive for biofilm formation. The 93.3% (n = 140) of the 150 isolates had the *clfA* gene, 87.3% (n = 131) the *eno*, 62.7% (n = 94) the *ebpS*, 54.7% (n = 82) *fib*, 54% (n = 81) the *fnbA*, 53.3% (n = 80) the *icaD*, 47.3% (n = 71) *icaA* and *clfB* gens, 43.3% (n = 65) the *fnbB*, 17.3% (n = 26) *bap*, 8% (n = 8) the *cna* and 4% (n = 40) *bbp* gene. The factors strain, temperature and surface were significant (Friedman test $p < 0.0001$) for both response variables in the formation of biofilms, while, time did not have significant difference ($p > 0.05$). The increased production of biofilm (assessed by optical density) was observed at 25 °C in stainless steel surfaces. The strains *S. epidermidis* ATCC 35984 and *S. aureus* 119 were the strains that showed the highest production of biofilm. In the tested surfaces, microbiological counts were observed in the range between 6.5 and 7.6 $\log_{10}$ CFU m^{-2} suggesting biofilm formation. The formation of biofilms in 6 evaluated strains has been confirmed by Scanning Electron Microscopy (SEM) on stainless steel and polypropylene on 5°C and 25°C with 12 and 96 h of incubation.

Keywords: CRA; MSCRAMM; Surfaces; SEM

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>agr</i>	Regulador de Genes Acessórios
ATCC	American Type Culture Collection
BAP	Proteína associada à formação de biofilme
<i>bap</i>	Gene codificador da proteína associada à formação de biofilme
BBP	Proteína ligadora de sialoproteína óssea
<i>bbp</i>	Gene codificador da proteína ligadora de sialoproteína óssea
BHI	Infusão de Coração e Cérebro
BPA	Baird Parker Ágar
CLFA	<i>Clumping factor A</i>
<i>clfA</i>	Gene codificador do <i>Clumping factor A</i>
CLFB	<i>Clumping factor B</i>
<i>clfB</i>	Gene codificador do <i>Clumping factor B</i>
CNA	Proteína ligadora de colágeno
<i>cna</i>	Gene codificador da proteína ligadora de colágeno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EBP	Proteína ligadora de elastina
<i>ebpS</i>	Gene codificador da proteína ligadora de elastina
ECP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
ECN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
ENO	Proteína ligadora de laminina
<i>eno</i>	Gene codificador da proteína ligadora de laminina
EPS	Exopolissacarídeo
FIB	Proteína ligadora de fibrinogênio
<i>fib</i>	Gene codificador da proteína ligadora de fibrinogênio
FNBA	Proteína A ligadora de fibronectina
<i>fnbA</i>	Gene codificador da proteína A ligadora de fibronectina
FNBB	Proteína B ligadora de fibronectina
<i>fnbB</i>	Gene codificador da proteína B ligadora de fibronectina
ICAA	Proteína A de adesão intercelular

<i>icaA</i>	Gene codificador da proteína A de adesão intercelular
ICAD	Proteína D de adesão intercelular
<i>icaD</i>	Gene codificador da proteína D de adesão intercelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIA	Polissacarídeo intercelular/adesina
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RPM	Rotação Por Minuto
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TSA	Tripticase de Soja Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies de *Staphylococcus* são patogênicas para humanos e animais, além de muitas serem oportunistas, causando grandes problemas tanto no setor de alimentos como na área médica (RODEA et al., 2007; MA et al., 2012). *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo muito adaptável e pode viver em uma grande variedade de ambientes. Além da produção de exotoxinas e proteínas de superfície, a formação de complexos multicelulares altamente organizados, como os biofilmes, é cada vez mais reconhecida como um importante fator de virulência em *S. aureus* (TANG et al., 2011).

Os biofilmes bacterianos são comunidades complexas de organismos contendo camadas de bactérias dentro de um glicocálice, assim, as bactérias são capazes de aderir-se a superfícies bióticas e abióticas. Um biofilme maduro contém estruturas tridimensionais específicas, referidas como torres ou cogumelos, separados por canais cheios de líquido (ATSHAN et al., 2012; CUE et al., 2012). A formação de biofilme pode proteger a comunidade bacteriana de adversidades ambientais, do sistema imunológico do hospedeiro e de antibióticos, diferente do que ocorre com células planctônicas, vulneráveis e expostas (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013).

O primeiro relato de biofilme foi feito há mais de 70 anos (ZOBELL, 1943), e ainda é uma preocupação na área das indústrias, especificamente de alimentos, ambientais e biomédicas (FLINT et al., 1997; SIHORKAR; VYAS, 2001; MAUKONEN et al., 2003; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013).

O primeiro relatório publicado sobre biofilme bacteriano de origem alimentar descreveu as propriedades adesivas de *Salmonella* spp (DUGUID et al., 1966). Desde então, muitas bactérias foram identificadas na formação de biofilmes em instalações de indústrias de alimentos, tais como a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus* spp e *Escherichia coli* O157:H7 (SPIERS; RAINEY, 2005; ELHARIRY, 2011).

Os micro-organismos possuem uma tendência natural de se fixarem em superfícies molhadas, se multiplicar e se incorporar em uma matriz viscosa constituída por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que formam um biofilme (WONG, 1998; FRANK; CHMIELEWSKI, 2001; JESSEN; LAMMERT, 2003; CHEN et al., 2007).

Os principais constituintes dos biofilmes de *Staphylococcus* spp podem ser compostos de polissacarídeos, adesinas proteicas, DNA extracelular, ácido teicóico, além de outros fatores plasmáticos de acolhimento (HEILMANN, 2011). A proporção destes componentes dentro da matriz do biofilme é altamente variável e muda em resposta aos fatores ambientais (CUE et al., 2012).

A formação de biofilme depende de muitos fatores, como rugosidade da superfície, temperatura, energia superficial, pH do meio e das condições da superfície entontradas nos laticínios favorecem o desenvolvimento dos biofilmes. Os produtos lácteos são muito suscetíveis à contaminação por biofilmes e é um desafio eliminá-los (SREY et al., 2013). Existem evidências indicando que o modo de vida na forma de biofilme leva ao aumento da resistência a agentes antimicrobianos (LANGSRUD et al., 2003; SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, 2010). Em biofilmes, os micro-organismos apresentam maior resistência aos sanitizantes do que na forma de células planctônicas, o que faz com que a eliminação de biofilmes de instalações de processamento de alimentos seja um grande desafio. Além disso, a presença de bactérias resistentes a antibióticos e sanitizantes convencionais, mostra que são necessárias novas estratégias no controle de biofilmes (SIMÕES et al., 2006; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013).

Corroborando estas informações, Rodea *et al.* (2007) citam que em todo o mundo alimentos processados e frescos são relacionados com surtos de intoxicação causados por *S.aureus*, sendo este frequentemente encontrado em indústrias alimentícias, onde diferentes materiais são utilizados em superfícies de contato, como utensílios ou equipamentos.

Dentre os materiais utilizados nas indústrias de alimentos, pode-se citar o aço inoxidável, o mais utilizado na indústria de laticínios, cuja composição da liga inclui carbono, cromo e níquel. Há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18% de cromo e 8% de níquel são os mais empregados. Nesse grupo, estão as ligas da classe 300, por exemplo a 304 e 316, que são resistentes à corrosão causada pela maioria dos alimentos, detergentes e sanitizantes. A resistência do aço inoxidável deve-se à película protetora de óxido de cromo, que se forma na presença de oxigênio (ANDRADE, 2008). Adicionalmente, são facilmente higienizáveis e relativamente baratos.

Outro material bastante empregado pelas indústrias alimentícias é o polipropileno, que tem sido empregado na fabricação de tanques, tubulações,

acessórios e superfícies envolvidas no corte de alimentos (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

Desta forma, considera-se de extrema importância determinar o grau de adesão bacteriana, especialmente por patógenos, e a formação de biofilme em superfícies de polipropileno e aço inoxidável, o que pode possibilitar a contaminação cruzada de alimentos.

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são desencadeadas por agentes causadores consumidos juntamente com os alimentos. Conforme indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção de alimentos para o consumo e pode ter origem contaminação ambiental, incluindo a poluição da água, do solo ou ar (WHO, 2007). Segundo a OMS, DTAs são um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (WHO, 2007)

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica em Saúde, no período compreendido entre 2000 e 2014, o *S. aureus* ocupou o terceiro lugar como agente etiológico de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), envolvendo 9,23% dos casos registrados. Na relação de alimentos envolvidos nos surtos, observou-se 356 casos provocados por leite e derivados (SINAN, 2014).

A doença transmitida por *S. aureus* é uma intoxicação provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas. A ingestão de uma dose menor que 1µg pode provocar os sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10⁶ UFC/g de alimento. Os sintomas são evidenciados entre duas a seis horas depois da ingestão e incluem náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e queda de temperatura (SILVA et al., 2010, p.153).

S. aureus pode formar biofilmes no úbere de vacas que sofrem de mastite. Os biofilmes prejudicam a ação do sistema imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, favorecendo a persistência da infecção (MELCHIOR et al., 2006).

É importante o estudo deste patógeno na matéria-prima, sendo que o leite recebe destaque neste contexto, devido às possibilidades de contaminação, que, nos casos de mastite, podem ocorrer desde o úbere da vaca até o produto final. Melchior et al. (2006) observaram que as cepas de *S. aureus* isolados de vacas com mastite são capazes de formar biofilme e são frequentemente associadas à presença do locus *ica* (adesão inter-celular) no úbere.

Além disso, este micro-organismo tem capacidade de formar biofilmes também sobre diferentes superfícies inertes. Por exemplo, em plantas de processamento de alimentos pode ocorrer contaminação cruzada devido ao desprendimento das células bacterianas do biofilme durante o processo produtivo dos alimentos, causando contaminação dos mesmos.

Nos estudos de biofilme foram identificados e caracterizados fatores extracelulares que influenciam a ligação à superfície e adesão intercelular em *S. aureus*, que poderia produzir polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) e polimérica de N –acetilglucosamina (PNAG), um polissacárido de superfície (CRAMTON et al., 1999). PNAG contribui para o acúmulo de biofilme e evasão imune em *S. aureus*, codificada pelo *ica* operon compreendendo os *ica* genes ADBC (HEILMANN et al.,

2011). Os mecanismos dos genes *ica* ABCD são os mecanismos melhor entendidos, no desenvolvimento dos biofilmes em *Staphylococcus* spp (MARTINS et al., 2013).

Além dos exopolissacarídeos, as proteínas de superfície desempenham também um papel importante na formação de biofilme. A maioria das proteínas de superfície estão envolvidas em várias características estruturais e funcionais dos biofilmes. O primeiro membro deste grupo foi descrito em um *S. aureus* proveniente de mastite bovina e foi nomeado como proteína associada ao biofilme (BAP) (LASA; PENADÉS, 2006). Cucarella et al. (2004) observaram que todos os estafilococos isolados testados que apresentaram o gene *bap* foram fortes produtores de biofilme, apesar do fato de que a maioria deles não continha o operon *ica* ADBC.

Além disso, diferentes genes que codificam outras adesinas também influenciam na formação de biofilmes os quais estão relacionados com adesinas proteicas associadas à superfície, tais como as proteínas de superfície codificadas pelos genes: proteína de ligação à elastina (*ebpS*), proteína de ligação à laminina (*eno*), proteínas de ligação ao colágeno (*cna*), proteínas de ligação à fibronectina A e B (*fnbA*, *fnbB*), proteína de ligação ao fibrinogênio (*fib*), fatores de aglomeração A e B (*clfA*, *clfB*), proteína ligadora de sialoproteína óssea (*bbp*), proteína associada ao biofilme (*bap*) (JOSEFSSON et al., 2005; ATSHAN et al., 2012).

Na presente pesquisa foram utilizados cupons de aço inoxidável 304 com polimento sanitário para simular equipamentos utilizados em laticínios, e os de polipropileno para simular o material das formas de queijo.

Existe uma escassez de pesquisas publicadas com esses genes em isolados provenientes de laticínios no Brasil.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Staphylococcus* spp

Os *staphylococcus* – do grego *staphyle* (uvas em cacho) e *cocos* (grão) – são cocos Gram-positivos, imóveis, de 0,5-1,5 μ m, que se apresentam agrupados em massas irregulares ou em forma de cachos de uva (Figura 1). Crescem bem nos meios de cultura mais comuns, como o caldo simples ou ágar simples (pH 7,0), a temperatura ótima de 37°C. Em placa contendo ágar simples, após 24 horas de incubação a 37°C, *Staphylococcus* spp. produzem colônias de cerca de 1-3 mm de diâmetro, convexas, de superfície livre e bordas circulares, de coloração opaca ou brilhante. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, estes micro-organismos fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, e nisso se diferenciam dos micro-organismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (BAIRD-PARKER, 1990; KLOOS; BANNERMAN, 2003).

Figura 1 - Morfologia de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp

A classificação taxonômica do gênero é:

Reino: Monera

Filo: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordem: Bacillales

Família: Staphylococcaceae

Gênero: *Staphylococcus*

(HOLT, 1984; LINDSAY, 2008).

Existem mais de 50 espécies e 26 subespécies no genero *Staphylococcus* spp, descritas atualmente, mas sua taxonomia está em constante evolução (LPSN, 2015). Normalmente, são comensais de pele e mucosas, mas embora algumas espécies permaneçam sempre como tais, outras podem atuar como patógenos oportunistas em condições propícias e são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções em seres humanos e animais (ARCIOLA et al., 2002; GOTZ, 2002; JAIN; AGARWAL, 2009; PETTIT et al., 2005; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; VANNI et al., 2009).

O gênero é comumente dividido em *Staphylococcus* coagulase-positivos (ECP) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN), com base em sua capacidade de produção de coagulase e de coagular plasma. A maioria das espécies são do gênero ECN. Existem apenas sete espécies de ECP a saber: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* (KLOOS; BANNERMAN, 2003; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; SASAKI et al., 2007).

3.2 Formação do biofilme

Segundo Le et al. (2014); Otto (2013) e O'Toole et al. (2000), a formação de biofilme é um processo dinâmico, que de uma forma sequencial envolve adesão (A); proliferação e formação (B) e maturação e dispersão (C). A formação de biofilme de *Staphylococcus spp* apresenta essas três fases (Figura 2).

Na primeira fase, os micro-organismos planctônicos movem-se em estreita proximidade com a superfície, a qual pode ter várias características físico-químicas importantes para determinar a taxa e a extensão dos processos de ligação. Durante a adesão as proteínas de superfície presentes na parede celular dos estafilococos são importantes e são conhecidos como componentes das superfícies microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesivo (MSCRAMM): Essas proteínas estabelecem a união não covalente, assim também as interações com as proteínas dos tecidos do hospedeiro. Já os ácidos teicoicos favorecem a adesão bacteriana nas superfícies abióticas (GROSS et al., 2001). Além disso, o substrato exposto num meio aquoso pode tornar-se revestido por moléculas, a chamada camada condicionada, e a modificação físico-química resultante pode inibir ou promover a adesão microbiana (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014; PERCIVAL et al., 2011).

Figura 2 - Estágios de desenvolvimento do biofilme. (A) Fatores de adesão, (B) Fatores de maturação, (C) Fatores de dispersão. Componentes das superfícies microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesivo (MSRCRAMMS). Polissacarídeo intercelular/adesina (PIA). *Phenol-Soluble- Modulins* (PSMs). Adaptado de Le et al. (2014)

Na segunda fase da formação de biofilmes em estafilococos acontece a maturação, onde ocorre a produção de uma matriz extracelular de diversos polissacarídeos, como por exemplo o polissacarídeo intercelular/adesina (PIA), assim como a produção de ácidos teicoicos, proteínas e DNA extracelular. Além disso, acontece divisão celular, recrutamento de micro-organismos adicionais a partir do ambiente local e comunicação entre as células (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

Ao final, as células começam a se desprender do biofilme e são expulsas no ambiente, pela ação das proteínas estafilocócicas chamadas *Phenol-Soluble-Modulins* (PSMs), as proteases e as nucleases.

Durante a segunda e terceira fase da formação do biofilme acontece a ação das PSMs, das proteases e nucleases, que favorece a formação de canais e estruturas em forma de cogumelos, provocando assim uma melhor difusão (OTTO, 2013). O transporte de células microbianas de uma superfície geralmente é feito por uma série de processos dinâmicos de fluidos, incluindo o movimento Browniano e efeitos gravitacionais (CHARACKLIS, 1981).

Assim, o biofilme proporciona um ambiente ideal para troca de material genético e comunicação entre as células dos micro-organismos. As taxas de transferência genética em biofilmes apresentam ordens de magnitudes mais elevadas do que entre as células de vida livre, como resistência a antibióticos, sanitizantes, detergentes, entre outros (DONLAN, 2002). Dentro da comunidade biofilme, micro-organismos comunicam-se uns com os outros por meio de moléculas de sinal químico, designado por auto-indutores, em resposta à densidade de população, num processo que é chamado de “*quorum sensing*” (WANNER; GUJER, 1986).

Em superfícies de contato com alimentos (Figura 3) o processo inicia-se com os resíduos de alimentos nas superfícies, segundo os resíduos são contaminados por patógenos, uma vez que as moléculas biologicamente ativas (bactérias) são atraídas pelas moléculas orgânicas (alimentos). Posteriormente, as células microbianas que resistem à limpeza e desinfecção iniciam seu crescimento. Por último os micro-organismos formam os biofilmes mediante a expressão gênica e a detecção do *quorum sensing* (SHI; ZHU, 2009).

Figura 3 - Formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos. Adaptado de Shi; Zhu, (2009)

Nos *Staphylococcus* spp. os fatores de virulência não são expressos constantemente. É vantajoso para a bactéria coordenar quando esses fatores serão produzidos. A expressão da maioria dos genes de virulência de *S. aureus* é controlada por um sistema de regulação global composto por dois operons divergentes, denominado *agr* (*accessory gene regulator*). A atuação do sistema *agr* está associada ao *quorum sensing* em *S. aureus*, mecanismo pelo qual uma bactéria ativa a produção de proteínas à densidade celular do meio em que se encontra. O efeito *quorum sensing* é conseguido pela bactéria devido a uma comunicação entre as células presentes no mesmo ambiente por meio de moléculas secretadas por uma célula e detectadas por outras, similar ao sistema endócrino dos animais (MCCULLOCH, 2006; MARTINS et al., 2013).

A expressão do sistema *agr* contribui com a patogênese estafilocócica em diferentes momentos da infecção. Considerando a curva de crescimento de *S. aureus*, observa-se que todas as exoproteínas são secretadas na fase pós-exponencial. É de conhecimento que as proteínas associadas à membrana como a proteína A e as adesinas são produzidas durante a fase exponencial e não na fase pós-exponencial (BOHACH; FOSTER, 2000; MARTINS et al., 2013). O locus *agr* tem uma atuação

positiva na regulação da expressão dos genes de exoproteínas, e negativa na síntese de adesinas de superfície celular, que ocorre durante a transição da fase exponencial para pós-exponencial (CHEUNG et al., 2004).

O gene regulador acessório (*agr*) e o gene regulador (*sarA*) desempenham papéis opostos em *S. aureus* na formação de biofilme. Há indícios crescentes que sugerem que esses papéis opostos são terapeuticamente relevantes, sendo que a mutação de *agr* resulta em aumento da formação de biofilme e diminuição da sensibilidade aos antibióticos, enquanto mutação do *sarA* tem efeito oposto (BEENKEN et al., 2010).

3.3 Genes relacionados à produção de biofilme

Na formação de biofilme, a ligação inicial da bactéria a uma superfície sólida resulta na proliferação e acúmulo de grupos de células em multicamadas com a formação final de um reservatório bacteriano (STOODLEY et al., 2002), este é estrategicamente posicionado, dificultando a penetração e difusão de antimicrobianos e de elementos de defesa do organismo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Um grupo de proteínas de superfície está emergindo como um importante elemento no processo de formação de biofilme de diversas espécies bacterianas. O primeiro membro desse grupo de proteínas foi identificado em um isolado de *S. aureus* de amostras de mastite bovina, como sendo uma proteína essencial para a formação de biofilme (CUCARELLA et al., 2001), cujo gene foi denominado proteína associada à formação de biofilme (*bap*).

Estudos de ligação primária, agregação intercelular e formação de biofilme mostraram que *bap* promove tanto a ligação primária às superfícies abióticas como a adesão intercelular. Uma vez que a interrupção do gene *bap* provoca a diminuição no acúmulo do principal exopolissacarídeo da matriz do biofilme de *S. aureus*, a primeira interpretação desse resultado foi que a deficiência de biofilme em linhagens mutantes de *bap* era causada principalmente pela diminuição do acúmulo desses exopolissacarídeo denominado polissacarídeo adesina intercelular (PIA/PNAG) (LASA; PENADÉS, 2006).

A avaliação sobre a influência da presença de BAP na aderência de *S. aureus* às proteínas do hospedeiro, culturas de células epiteliais e regiões da glândula mamária tem indicado que linhagens *bap* positivas mostram aderência inferior ao

fibrinogênio imobilizado, à fibronectina e às culturas de células epiteliais (CUCARELLA et al., 2002). Estudos experimentais sobre a infecção da glândula mamária têm indicado que BAP pode atuar como um fator que impede a ligação bacteriana inicial aos tecidos do hospedeiro, embora, ainda que em longo período, a presença de BAP facilite a persistência de *S. aureus* na glândula mamária (CUCARELLA et al., 2004).

Segundo Cucarella et al. (2004) a inativação do codificador de proteínas o operon *icaADBC* envolvida na síntese de PIA/PNAG em uma linhagem *bap* positiva não teve efeito na formação de biofilme *in vitro*. Resultados semelhante encontrados por Tormo et al. (2005) demonstram que todos os isolados estafilocócicos testados que continham o gene *bap* eram fortemente produtores de biofilme, apesar da maioria deles não conter o operon *icaADBC*. Tais resultados indicam que o gene *bap* é capaz de mediar um outro mecanismo de desenvolvimento de biofilme, alternativo ao mecanismo regular dependente de polissacarídeo adesina intercelular PIA/PNAG (LASA; PENADÉS, 2006).

3.4 Adesinas

A adesão é o passo fundamental na formação de comunidades de biofilme que é facilitada pela expressão dos MSCRAMMs que podem se vincular a um ou mais sítios da matriz extracelular, incluindo elastina (*ebpS*), laminina (*eno*), colágeno (*cna*), fibronectina A e B (*fnbA* e *fnbB*), fibrinogênio (*fib*), sialoproteína óssea (*bbp*) e os fatores de aglomeração A e B (*clfA* e *clfB*) (SEO et al., 2008).

A fibronectina é uma adesina codificada pelo gene *fnbA* de *S. aureus*. É uma proteína presente em forma solúvel no sangue, e em forma fibrilar nas matrizes celulares (PATTI et al., 1994). A proteína ligadora de fibronectina (FnBP) é um exemplo dos determinantes bacterianos que apresentam múltiplas funções. Nesse caso, a proteína também é uma adesina para o fibrinogênio (WANN et al., 2000). As FnBPs têm sido propostas como fatores de virulência envolvidos em mastite bovina (SUTRA; POUTREL, 1994). Pelo menos um dos genes codificadores dessa proteína é encontrado na maioria das linhagens de *S. aureus* (SMELTZER et al., 1997).

Estudos investigam o papel individual dos fatores relacionados à virulência realizando as clássicas inativações de genes. Porém, tais estudos podem gerar resultados inconclusivos considerando-se a multiplicidade de fatores de virulência que

são expressos por *S. aureus*. Como exemplo desse complexo contexto, Que et al. (2001) propuseram que as quatro maiores adesinas de superfície, clumping factor A (*ClfA*), clumping factor B (*ClfB*) e as proteínas ligadoras de fibronectina A e B demonstram alta afinidade na ligação com seus alvos específicos in vitro, porém têm limitada relevância em experimentos in vivo. Os autores também sugeriram que uma explicação possível para o paradoxo in vitro/ in vivo seria a presença de fatores adicionais nos mutantes portadores de genes inativados que poderiam complementar, no processo da doença, a função das adesinas perdidas.

Quanto à frequência do gene *cna* - codificador da proteína ligadora de colágeno - em isolados animais, Smeltzer et al. (1997) relataram que linhagens *S. aureus* geralmente não o possuem. Em outro estudo, Reinoso et al. (2008) observaram que a detecção desse gene pôde ser efetuada somente para cinco linhagens humanas na caracterização e comparação genotípica de *S. aureus* isolados de amostras humanas, mastite bovina subclínica, e de alimentos.

A proteína BBP codificada pelo gene *bbp* interage com a sialoproteína óssea (BPS) que é um componente essencial da matriz extracelular óssea e dentina (YACOUN et al., 1994; WIŚNIEWSKA et al., 2014). As doenças associadas com BBP preferencialmente são a osteomielite e artrite séptica (BREMELL et al., 1991; RYDEN et al., 1987, 1997). Um estudo realizado por Campoccia et al. (2009) mostrou que a presença do gene *bbp* em *S. aureus* causa infecções nos implantes ortopédicos. Além disso, a co-existência de BBP e a proteína ligadora de colágeno (CNA) sugere que estas duas adesinas podem agir em conjunto nas infecções de implantes. A combinação dos genes *bbp* e *cna* também foi encontrada no tipo de pandemia de resistência à meticilina adquirido na comunidade *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA (ARNOLD et al., 2006; MONTANARO et al., 2010).

3.5 Biofilmes em laticínios

As principais fontes de contaminação do leite e produtos relacionados são comumente decorrentes de limpeza e sanitização inadequadas de equipamentos (GIBSON et al., 1999; JESSEN; LAMMERT, 2003). É de extrema importância higienizar os equipamentos de processamento considerando-se tanto a composição inorgânica dos depósitos como a microflora constitutiva. A formação de biofilmes em indústrias de produtos lácteos é predominantemente por substâncias bacterianas

poliméricas extracelulares (EPS) nos resíduos de leite (FLINT et al., 1997; MITTELMAN, 1998).

Além do problema de contaminação por patógenos, a formação de biofilmes em equipamentos da indústria de laticínios pode levar a sérios problemas gerados por falta de higiene, causando perdas econômicas, devido principalmente a deterioração dos alimentos e ao mau funcionamento dos equipamentos (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; GRAM et al., 2007).

Um número significativo de relatos surgiu sobre a persistência de alguns patógenos de origem alimentar em superfícies de contato com alimentos e biofilmes, afetando a qualidade e a segurança dos produtos alimentares (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010). Surtos de patógenos associados com biofilmes têm sido relacionados com a presença de *Staphylococcus* spp (KUMAR; ANAND; 1998; WONG, 1998; SHARMA; ANAND, 2002).

Patógenos causadores de DTA podem contaminar equipamentos de processamento de leite e as fontes são variadas, como por exemplo ambiente de fazendas de gado leiteiro, pela contaminação fecal, pelos de animais, leite de vacas com mastite, bem como através da água utilizada nas máquinas de ordenha (OLIVER; JAYARAO; ALMEIDA, 2005; BERTELLONI et al., 2015).

Estes micro-organismos contaminantes podem formar biofilmes difíceis de eliminar e podem atuar como substrato para outros micro-organismos menos propensos à formação de biofilme, aumentando a probabilidade de sobrevivência de patógenos durante o processamento de alimentos (LEHNER et al., 2005; LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006).

Contaminações pós-pasteurização de produtos lácteos ocorrem principalmente nas máquinas de enchimento, superfícies das juntas, pisos, paredes, ar, manipuladores e sistemas de limpeza (HOLAH, 1992; AUSTIN; BERGERON, 1995; GIBSON et al., 1999; DOGAN; BOOR, 2003; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

NA indústria de laticínios as propriedades dos materiais das superfícies de contacto, parâmetros ambientais, assim como características das células bacterianas são consideradas de grande importância durante o processo de desenvolvimento da união celular, bem como para a formação de biofilmes (DONLAN, 2002), essas principais propriedades estão apresentadas no quadro 1.

Propriedades		
Substrato	Fluido	Células
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Textura e Rugosidade ✓ Hidrofobicidade ✓ Condicionamento do biofilme 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Velocidade do fluxo ✓ pH ✓ Temperatura ✓ Cátions ✓ Presença de sanitizantes agentes antimicrobianos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hidrofobicidade da superfície celular ✓ Fímbrias ✓ Flagelos ✓ Substâncias poliméricas extracelulares

Quadro 1 - Relação das propriedades para substrato, fluido e células

Fonte: Donlan (2002)

3.6 Métodos para detecção de biofilme

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o cultivo e quantificação de biofilmes (DEIGHTON, et al., 2001; HARRAGHY et al., 2006). A quantificação de biofilmes começou a ser avaliada com um método baseado no cultivo sobre a parede de um tubo de ensaio e subsequente detecção por coloração de reconhecimento e espectrofotometria (CHRISTENSEN et al., 1982). Atualmente, diferentes métodos são usados, tais como tubo de ensaio, ensaio de micro-placa, radiomarcagem, microscopia e teste de placa de ágar com vermelho congo, (DEIGHTON et al., 2001; HARRAGHY et al., 2006). No entanto, o método da micro-placa permanece entre os ensaios mais utilizados para investigação de biofilme bacteriano, e uma série de modificações foi desenvolvida para o seu cultivo *in vitro* e quantificação (STEPANOVIĆ et al., 2007).

Entretanto, novos métodos moleculares trouxeram evidência direta, com base genética, da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp, desde a descoberta do operon *ica*, que está diretamente relacionado com a produção de EPS (ARCIOLA et al., 2002). Posteriormente foi identificado o gene *bap* relacionado-o com a formação de biofilme (CUCARELLA et al., 2001). Outras, pesquisas indicaram a existência de diversas adesinas como *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *bbp*, *eno*, *SasC*, *SasG*, *Aap*, presentes na parede celular dos *Staphylococcus* spp, as quais favorecem a adesão celular e posterior formação de biofilmes (NEMATÍ et al., 2009; MARTÍ et al., 2010; SPEZIALE et al., 2014).

3.6.1 Ágar Vermelho congo

Vermelho Congo ou Vermelho do Congo (VC) é o sal sódico do ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$. É um corante diazo secundário que foi sintetizado em 1883 por Paul Bottiger (AXELSON et al., 2008; TAPALAD et al., 2008). O corante VC devido à mudança de cor de azul para vermelho em pH 3,0 a 5,2 pode ser usado como indicador de pH.

Freeman; Falkiner; Keane, (1989) propuseram o método do ágar vermelho Congo (AVC) como alternativa para a detecção da produção de biofilme, alegando ser mais confiável do que o método de Christensen et al. (1982). A precisão do método AVC para detecção da produção de biofilme já foi comparada com métodos de biologia molecular, assim como, pela quantificação de biofilmes em microplacas e apresentaram bons resultados (ARCIOLA et al., 2002; JAIN; AGARWAL, 2009).

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar genotipicamente e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite subclínica do estado de São Paulo – Brasil.

Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade de formação de biofilme em 150 isolados de *Staphylococcus* spp, pela metodologia do Agar Vermelho Congo (AVC).
2. Pesquisar a presença dos genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* e *clfB* em 150 isolados de *Staphylococcus* spp.
3. Selecionar 10 cepas com perfis genotípicos diferentes e fenótipos diferentes (AVC) para avaliar a produção de biofilmes em superfícies de aço inoxidável e polipropileno.
4. Avaliar o efeito dos fatores cepa, tempo, temperatura e tipo de superfície usando duas metodologias: Cristal Violeta (Densidade Óptica- DO) e contagem de micro-organismos viáveis em placa ($\log_{10}\text{UFCcm}^{-2}$).
5. Estudar a relação entre os fatores cepa, tempo, temperatura e tipo de superfície.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em três etapas (Figura 4) a partir de 150 isolados de *Staphylococcus* sp.

1. Determinar o fenótipo das cepas na formação de biofilme, sendo realizado pelo método do ágar vermelho congo.
2. Detecção dos genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* e *clfB* pela metodologia da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), genes que estão relacionados com a formação de biofilme
3. Quantificação da formação de biofilme avaliando 13 cepas, das quais 10 cepas foram do presente estudo e três cepas padrão: *S. aureus* ATCC 6538 (+), *S. epidermidis* ATCC 35984 (+), *S. epidermidis* ATCC 12228 (-) testadas em três tempos (12h, 48h, 96h), duas temperaturas (5°C, 25°C) e duas superfícies (aço inoxidável 304, polipropileno) usando a metodologia do Cristal Violeta (Densidade óptica-DO) recuento em placa ($\log_{10}$ UFC cm^{-2}).

Figura 4 - Esquema de trabalho

5.1 Origem das cepas e identificação

Os isolados que foram utilizados fazem parte da coleção formada pelo laboratório de Higiene e Laticínios LAN-ESALQ-USP durante o desenvolvimento de pesquisas anteriores, realizadas em laticínios no Estado de São Paulo, no período de março de 2012 a fevereiro de 2013.

Foram testados 131 isolados de *S. aureus*, 8 de *S. hycus*, 6 de *S. epidermidis*, 2 de *S. warneri*, 1 de *S. chromogenes* e 2 de *S. xilosus* os quais estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1- Relação dos isolados que foram utilizados

Origem	<i>S. aureus</i>	<i>S. hycus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. xilosus</i>
Leite cru*	27	3	0	0	0	0
Embaladeira*	1	0	0	0	0	0
Forma de queijo*	1	0	0	0	0	0
Leite pasteurizado*	1	0	0	0	0	0
Manipulador*	18	0	6	2	0	0
Mesa*	3	0	0	0	0	0
Piso*	1	0	0	0	0	0
Queijo depois da embalagem*	23	1	0	0	0	0
Queijo antes da embalagem*	8	0	0	0	0	0
Salmoura*	2	0	0	0	0	0
Tanque de expansão*	4	0	0	0	0	0
Leite de vacas com mastite subclínica**	42	4	0	0	1	2
Total (150)	131	8	6	2	1	2

*isolados coletados de laticínios em linhas de produção de queijo minas frescal, ** isolados coletados em fazendas direto da vaca

5.2 Estudo Fenotípico

5.2.1 Ágar vermelho congo (AVC)

Foram avaliados os 150 isolados de *Staphylococcus* spp coagulasse positiva e negativa coletados em laticínios e leite de vacas com mastite subclínica (Tabela 1). Os isolados foram reativados em caldo BHI e mantidos a 37 °C por 24 horas em

aerobiose. Na avaliação pelo AVC foram usados 0,8g de corante vermelho congo para 1 L de Brain Heart Infusion Agar (BHI), e 50 g de sacarose (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). As placas contendo o AVC foram inoculadas e incubadas à 37°C por 24 horas em aerobiose. As colônias cinzas, cinza escuro e pretas produzidas foram utilizadas diferenciando de cepas não produtoras de biofilmes, que apresentaram colônias vermelhas.

5.3 Estudo Genotípico

5.3.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)

Nesta fase do projeto, os isolados foram reativados em caldo BHI e mantidos a 37 °C por 24 horas. Duas repicagens sucessivas foram realizadas, a fim de obter máximo crescimento bacteriano para a extração do DNA.

Para a obtenção do pellet, 1,5 mL de meio de cultura contendo as células foi transferido para um microtubo que foi centrifugado a 12.000 RPM, durante 30 segundos a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido 2 a 3 vezes até obtenção do pellet desejado. O pellet foi submetido à metodologia de extração de DNA conforme recomendações do fabricante do kit AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep (Axygen Scientific Corporation, Union City, CA, USA).

Alíquotas (5 µL) dos DNA extraídos foram acrescidos de tampão Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega Corporation, Madison, EUA) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,0% (m/v), contendo brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel), após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-Borato; 1mM EDTA pH 8,0).

Para a fotodocumentação do gel foi utilizado o Image Lab™ Software do Molecular Imager Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), posteriormente as amostras foram armazenadas a -20 °C.

5.3.2 Perfil genotípico de *Staphylococcus* coagulase positiva (ECP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (ECN) formadores de biofilmes

Após a extração do DNA das 150 cepas de ECP e ECN, e das cepas padrão conforme descrito no item 5.3.1 (Extração do ácido desoxirribonucleico), foram utilizados oligonucleotídeos para a amplificação dos genes *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp*, *cna*,

ebpS, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* e *clfB*, conforme apresentados na Tabela 2. Na pesquisa dos genes também foram utilizados como controle positivo, cepas padrão apresentadas na Tabela 2.

A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1 X, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), MgCl₂, 1 U de Taq Polimerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega Corporation, Madison, EUA), 1 µL de DNA molde, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2); água ultrapura esterilizada Milli-Q até volume final de 25 µL.

Para os genes *icaA*, *icaD* e *bap* foram realizadas reações individuais PCR. Para os genes (*ebpS*, *fnbA*), (*fnbB*, *clfA*), (*fib*, *clfB*) realizou-se duplex PCR respectivamente, e para os genes (*eno*, *bbp*, *cna*) foi realizada uma tríplex. As condições são apresentadas na tabela 2.

Todos os tratamentos foram realizados no termociclador Bio-Rad C-1000 (Bio-Rad, Hércules, EUA), a programação do mesmo foi realizada nas condições mostradas na Tabela 2. Em seguida, os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese (80V, 80 mA, 120 minutos) em gel de agarose 1% (m/v) tampão 0,5 X TBE (45 mM Tris-borato), corado com brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel). Foi aplicado um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb). A imagem do gel foi capturada por um digitalizador sob trans-iluminação ultravioleta usando o Image Lab™ Software do Molecular Imager Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) (SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, 2010).

Tabela 2 - Relação dos oligonucleotídeos que foram utilizados para a identificação genotípica de ECP e ECN

(continua)

Sequencia de oligonucleotídeos (5' –3')	Tamanho do produto de PCR em pares de bases (pb)	Cepa padrão <i>S. aureus</i>	Programação	MgCl ₂ (mM)	Referência
<i>Ica A</i> 5' -CCTAACTAACGAAAGGTAG-3' 5' -AAGATATAGCGATAAGTGC-3'	1315	N315	94°C/5 min (1 ciclo) 94°C/1 min 52°C/ 2 min (30 ciclos) 72°C/1 min 72°C/7 min (1 ciclo)	2.5	Vasudevan et al. (2003)
<i>ica D</i> 5' -AAACGTAAGAGAGGTGG-3' 5' -GGCAATATGATCAAGATAC-3'	381				
<i>bap</i> 5' -CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG-3' 5' -GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'	971	5008 E	94°C/5 min (1 ciclo) 94°C/45 seg 60°C/1 min (30 ciclos) 72°C/1 min 72°C/7 min (1 ciclo)	2.5	Vasudevan et al. (2003)
<i>bbp</i> 5' -AACTACATCTAGTACTCAACAACAG-3' 5' -ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT-3'	575	WB 49			
<i>cna</i> 5' -GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-3' 5' -GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-3'	423	FRI 361	94°C/5 min (1 ciclo) 94°C/1 min 55°C/1 min (30 ciclos) 72°C/1 min 72°C/10 min (1 ciclo)	2.5	Tristan et al. (2003)
<i>eno</i> 5' -ACGTGCAGCAGCTGACT-3' 5' -CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC-3'	302	WB 49			
<i>ebpS</i> 5' -AGAATGCTTTTGCAATGGAT-3' 5' -AATATCGCTAATGCACCGAT-3'	652	FRI 361	94°C/5 min (1 ciclo) 94°C/1 min 50°C/1 min (30 ciclos) 72°C/1 min 72°C/10 min (1 ciclo)	2.0	Vancraeynest, Hermans; Haesebrouck, (2004)
<i>fnbA</i> 5' -CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3' 5' -ATCAGCAGCTGAATTCCCATT-3'	127	FRI 361			

Tabela 2 - Relação dos oligonucleotídeos que foram utilizados para a identificação genotípica de ECP e ECN

(conclusão)

Sequencia de oligonucleotídeos (5' –3')	Tamanho do produto de PCR em pares de bases (pb)	Cepa padrão <i>S. aureus</i>	Programação	MgCl ₂ (mM)	Referência
<i>fnbB</i>					
5'-GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT-3'	524	USA 300	94°C/5 min (1 ciclo)	2.5	Tristan et al. (2003)
5' -CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC-3'			94°C/1 min		
			55°C/1 min (35 ciclos)		
			72°C/1 min		
<i>clf A</i>					
5' -ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3'	292	FRI 361	72°C/10 min (1 ciclo)	2.5	Tristan et al. (2003)
5' -CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3'					
<i>Fib</i>					
5' -CTACAACTACAATTGCCGTCAACAG-3'	404	WB 49	94°C/5 min (1 ciclo)	2.5	Tristan et al. (2003)
5' -GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC-3'			94°C/1 min		
			55°C/1 min (30 ciclos)		
			72°C/1 min		
<i>clf B</i>					
5' -ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC-3'	205	USA 300	72°C/10 min (1 ciclo)		
5' -TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3'					

5.4 Seleção das cepas para quantificação de biofilmes

A partir da caracterização genotípica dos 150 isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de laticínios e de leite de vacas com mastite subclínica, foram selecionadas 10 cepas com perfis genotípicos diferentes, considerando a presença de genes associados a formação de biofilme, tais como *icaA*, *icaD*, *bap*, *bbp* conforme observado na literatura (OSMAN et al., 2015; VANCRAEYNEST; HERMANS; HAESBROUCK, 2004; DE SILVA et al., 2002).

Para o controle e comparação da quantificação do biofilme foram selecionadas mais três cepas padrão, uma cepa *S.aureus* ATCC 6538 como controle positivo na formação de biofilme (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, 2013) e duas *S.epidermidis* a primeira *S.epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e a segunda *S.epidermidis* ATCC 12228 considerada como uma cepa pouco produtora de biofilme (ARCIOLA et al., 2002).

5.5 Quantificação da produção de biofilme pelo método da micro-placa

A quantificação da produção de biofilme foi realizada seguindo o esquema da Figura 5.

Figura 5 - Esquema de trabalho para quantificação do biofilme

5.5.1 Preparo dos cupons

Os cupons de aço inoxidável 304 com polimento sanitário, e os de polipropileno, ambos medindo aproximadamente 6 mm de raio, foram utilizados como superfícies para a formação dos biofilmes. A lavagem e sanitização individual dos cupons, foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Marques et al. (2007).

Assim, os cupons foram imergidos durante 10 minutos em acetona (98%), enxaguados com água destilada e submersos em detergente neutral. Posteriormente foi realizado um segundo enxágue e imersão em álcool (70% V/V), seguido por água destilada. A finalização deu-se através da secagem em estufa por 2 horas e esterilização em autoclave à 121°C durante 15 minutos.

5.5.2 Preparo do inóculo

As cepas foram transferidas a partir da cultura de reserva (TSA) ao meio líquido (BHI) e incubadas durante 24 horas em condições aeróbias, na faixa de 35°C a 37°C e diluídas até concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (escala 0,5 de MacFarland). Em seguida foram plaqueadas triplicatas de alíquotas de 1000 µl de BHI contendo inóculo (10^8 UFC mL⁻¹), diretamente em micro-placas de 24 poços com tampa de fundo chato contendo os cupons previamente preparados. As micro-placas foram incubadas aerobicamente durante 12, 48 e 96 h $\pm$ 30 min a 5 e 25°C sob condições estáticas, de acordo com cada tratamento.

5.5.3 Lavagem, coloração e leitura da densidade óptica

Após a incubação, os cupons foram transferidos para uma nova microplaca de 24 poços, com o auxílio de uma pinça estéril. Os cupons foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) a pH 7,2 para retirar as células plantônicas que não estão totalmente aderidas ao biofilme.

Após a lavagem, os cupons foram cobertos com 1000 µL de cristal violeta (1%) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a coloração, o corante foi aspirado de forma suave com ajuda de uma pipeta, e os cupons contidos nas micro-placas sofreram três lavagens com água destilada estéril. A secagem dos mesmos foi à temperatura ambiente. Após a secagem, o corante ligado às células foi ressolubilizado com a adição de 1000 µL de Ácido Acético Glacial 33%, em cada poço. As microplacas foram fechadas para evitar a evaporação, permanecendo em repouso a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. A partir da solução de corante e ácido acético contendo biofilme foram transferidas, alíquotas de 200 µL para uma nova micro-placa de 96 poços, de fundo chato, cuja leitura da densidade óptica foi realizada em um leitor de microplaca (Vitor™ X3, PerkinElmer) a 600 nm. Para a metodologia do cristal violeta, a análise da densidade óptica foi realizada em triplicata para cada

repetição. O resultado considerado foi a média obtida na triplicata (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013).

5.5.4 Contagem de células aderidas pela técnica da micro-gota

Após a incubação (Preparo do inóculo - item 5.5.2) foi removido um cupom de cada tratamento utilizando pinças esterilizadas. Os cupons foram lavados três vezes com PBS estéril e transferidos para tubos de ensaios contendo 9 mL de 0.1% (p/v) de solução de água peptonada, e foram tratados com ultra-som a 40 KHz com água a 30°C por 1 minuto (Sonicador UltraCleaner 800A, Unique®, São Paulo, Brasil). A partir da 1ª diluição, foram retiradas alíquotas de 1 mL para preparo das sucessivas diluições. Em seguida alíquotas de 10 µL foram transferidas para placas de PCA e Baird Parker Ágar (BPA), utilizando a técnica da micro-gota (SILVA et al., 2010). Em seguida as placas foram incubadas em aerobiose a 37°C/ 24 - 48 horas. A contagem microbiológica de células viáveis foi realizada em triplicata para determinar a população bacteriana aderida à superfície dos cupons, realizada utilizando-se a equação (1):

$$\text{UFC cm}^{-2} = \frac{\text{UFC mL}^{-1} \times \text{Volume de diluente (mL)}}{\text{área (cm}^2\text{)}} \quad (1)$$

5.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Após a quantificação do biofilme, foram selecionadas 6 cepas para análise em MEV: *S. aureus* ATCC 6538 foi utilizado como controle positivo na formação de biofilmes de *S. aureus*; *S. epidermidis* ATCC 12228 foi utilizada como padrão de pouco formadora de biofilme para a espécie *S. epidermidis* e a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 foi empregada como controle positivo para *S. epidermidis*. Da coleção isolada, foram selecionadas 3 cepas que apresentaram elevada densidade óptica (cristal violeta) e alta contagem microbiológica, sendo assim selecionadas as cepas *S. aureus* 119, isolada de leite cru, a cepa *S. epidermidis* 202 isolada de manipulador e a cepa *S. aureus* 47F isolada de leite de vacas com mastite subclínica.

Para observar a formação do biofilme foi repetido o preparo de cupons (item 5.5.1) e preparo do inóculo (item 5.5.2). Com o auxílio de pinças esterilizadas foram removidos dois cupons de cada tratamento (cepa), os quais foram transferidos para

uma nova micro-placa e lavados três vezes com PBS esteril. Os cupons com o biofilme aderido foram fixados com 5 gotas de solução de Karnovsky modificada, por cerca de 3 horas, sob refrigeração (5°C). Em seguida os cupons foram submetidos a vapores de ósmio por cerca 24 horas, e secos em sílica gel por 12 h. Posteriormente, os cupons foram montados em suportes especiais e identificados antes de serem colocados no metalizador para o banho de ouro. Após a metalização as amostras foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO 435 VP, Leo Electron Microscopy Ltda., Cambridge, England), do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA-ESALQ/USP).

(a) Metalização dos cupons com ouro

(b) Cupons metalizados prontos para análise

Figura 6 - Preparo dos cupons para análise por MEV

Foi empregada a MEV para observar as características externas dos micro-organismos, as células intactas e os componentes celulares presentes nas comunidades dos biofilmes. Mediante essa metodologia podem-se obter micrografias eletrônicas que facilitam a observação dos mesmos.

5.7 Análise Estatística

A análise estatística dos genes e do AVC foi realizada pelo Teste de Q de Cochran (1950), após comparações múltiplas mediante o procedimento de McNemar (Bonferroni), no software XLSTAT 2014. Tendo em vista que são variáveis dicotômicas considerou-se a presença do gene igual a um (1) e a ausência do mesmo como zero (0). Com relação ao AVC para cepas positivas para a formação de biofilme, foi estabelecido valor igual a um (1) e para cepas negativas valor igual a zero (0).

Para a quantificação do biofilme foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com fatorial de 13x3x2x2 conforme descrito na Tabela 3. Esta etapa do experimento foi repetida 3 vezes.

Tabela 3 - Fatores e níveis utilizados na presente pesquisa

Fatores	Níveis
Cepas (13)	47F, 85F, 79F, 141F, 47, 119, 79, 330, 201, 202, <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.
Tempo (3)	12, 48 e 96h.
Temperatura (2)	5°C e 25°C
Superfície (2)	Aço inoxidável e polipropileno

Para definir a análise estatística a ser aplicada e tendo como variáveis de resposta a densidade óptica (600nm) e a contagem microbiológica ($\log_{10}$ UFC cm⁻²), foram realizados os testes de normalidade - Kolmogorov-Smirnov (Software XLSTAT, 2014) e de homogeneidade de Variâncias -Teste de Levene (Software IBM SPSS STATISTICS 19), os quais indicaram uma análise não paramétrica.

Para análise das duas variáveis resposta, densidade óptica (DO) e contagem microbiológica e considerando-se que a amostragem era composta de 13 cepas de *Staphylococcus* spp, duas temperaturas, três tempos e duas superfícies (Tabela 3) optou-se pelo Teste de Friedman (1937). Para os fatores significativos foi aplicado o teste de comparações múltiplas por pares mediante o Teste de Nemenyi (Software XLSTAT, 2014).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Fenotípica

As cepas de *Staphylococcus* spp não produtoras de biofilme que foram caracterizadas como negativas pelo teste do AVC, apresentaram colônias com diversas tonalidades de vermelho (Figura 7), enquanto que as cepas caracterizadas como positivas apresentam colônias com tonalidades de cinza a preto (Figura 8).

Isolado N° = 6F, *S. aureus* (Leite de vaca com mastite subclínica)

Isolado N° = 216, *S. aureus* (Queijo depois da embalagem)

Isolado N° = 136, *S. epidermidis* (Manipulador de alimentos)

Figura 7- Cepas de *Staphylococcus* spp. não-produtoras de biofilme cultivadas sobre AVC

Isolado N° = 18F, *S. aureus* (vaca com mastite)

Isolado N° = 47, *S. aureus* (Queijo antes da embalagem)

Isolado N° = 123, *S. aureus* (leite cru)

Figura 8 - Cepas *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme cultivadas sobre AVC

Para a avaliação fenotípica da capacidade produtora de biofilmes pelo método do AVC, foram utilizados 150 isolados de *Staphylococcus* spp (Tabela 1). Do total de isolados, 38,7% foram positivos para o AVC (Tabela 4). Avaliando-se os dados de acordo com a origem, no grupo de isolados de laticínios, 35,6% apresentaram capacidade de formação de biofilme, enquanto que uma proporção maior (44,9%) de positivos foi observada no grupo dos isolados de leite de vacas com mastite subclínica.

Na avaliação por espécies, a capacidade de formação de biofilme foi positiva para 39,7% de *S. aureus*, 62,5 % de *S. hycus*, 16,7% de *S. epidermidis*, enquanto as demais espécies não mostraram capacidade de formação de biofilme (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados da avaliação fenotípica da capacidade de formação de biofilme pelo método AVC

Origem		N° de isolados	%
Total de isolados (150)	-	92	61,3
	+	58	38,7
Laticínio (101)	-	65	64,3
	+	36	35,6
Leite de vacas com mastite (49)	-	27	55,1
	+	22	44,9
Espécie			
<i>S. aureus</i>* (131)	-	79	60,3
	+	52	39,7
<i>S. hycus</i>* (8)	-	3	37,5
	+	5	62,5
<i>S. epidermidis</i>* (6)	-	5	83,3
	+	1	16,7
<i>S. warneri</i>* (2)	-	2	100
	+	0	0
<i>S. chromogenes</i>* (1)	-	1	100
	+	0	0
<i>S. xilosus</i>* (2)	-	2	100
	+	0	0

*corresponde à espécie dos 150 isolados utilizados, (+) positivo ao teste do AVC, (-) negativo ao teste do AVC

Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2006), foram utilizados 32 isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica bovina e foi demonstrado que 37,5% dos isolados produziram biofilme no AVC. Em outro trabalho realizado por Fabres-Klein et al. (2015), foram utilizados 54 isolados de *S. aureus* também provenientes de mastite subclínica, das quais 35,18% apresentaram resultado positivo no AVC. Em ambas pesquisas as porcentagens de isolados positivos no AVC foram menores do

que as encontradas no presente estudo. Já Szweda et al. (2012) avaliando 132 isolados de mastite subclínica obteve 57,6% de isolados positivos ao teste do AVC, porcentagem superior à observada nesta pesquisa.

6.2 Caraterização Genotípica

6.2.1 Resultados da avaliação genotípica da presença de genes para formação de biofilme pela metodologia da PCR

Para avaliação genotípica da presença de genes relacionados à capacidade de produção de biofilmes pelo método do PCR, foram utilizados 150 isolados de *Staphylococcus* spp (Tabela 5). O Teste Q de Cochran, usado para determinar a frequência relativa da presença dos 12 genes nos 150 isolados indicou que houve diferença significativa ($p < 0,0001$) na presença dos genes.

A partir destes resultados foram feitas comparações múltiplas pelo teste de McNemar (Bonferroni) apresentados na Tabela 5, pelas quais foi constatado que o gene *clfA* apresentou a maior frequência com 93,3%, seguido pelo grupo de genes *eno*, *ebpS*, *fib*, *fnbA*, *icaD*, *icaA* *clfB*, *fnbB* que apresentaram estatisticamente a mesma frequência relativa. A menor frequência foi obtida pelos genes: *bap*, *cna* e *bbp*, os quais não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Uma pesquisa realizada com 106 isolados de *Staphylococcus* spp, provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, mostrou que 82,1% dos isolados possuíam o gene *eno*, 72,6% *fnbA*, 71,7% *fib*, 56,6% *bap*, 17,9%, *ebpS*, 17% *cna* e 5,7% *fnbB* (ZUNIGA et al., 2015), resultados similares com os encontrados na presente pesquisa.

Enquanto que em outra pesquisa com 124 isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de leite de cabra com mastite subclínica foram encontrados valores de 57,2% para o gene *eno*, 46,8% para o *bap*, 20,2% para o *ebpS*, 18,5% para o *fnbA*, 17,7% o *fib*, 0,8% para o *cna* e ausência do gene *fnbB* (SALABERRY et al., 2015), mostrando que o gene *eno* é frequentemente identificado em isolados provenientes de *Staphylococcus* spp.

Comparando-se os resultados do presente estudo com outras pesquisas realizadas com isolados clínicos observou-se que a prevalência dos genes é similar. Assim, Emameine et al. (2015) trabalharam com 17 isolados clínicos de *S. aureus*, provenientes de crianças com doenças no ouvido e observaram que 76,4 % dos isolados possuíam o gene *eno*, *icaA* e *icaD*, 58,8% os genes *fib* e *fnbB*, 23,5% *cna* e

5,8% *fnbA*. Enquanto que Merghni et al. (2015) avaliaram 20 isolados de *S. aureus* provenientes da cavidade oral de pacientes tunisinas e observaram que 76,2% dos isolados possuíam o gene *icaA* e *icaD*, 90,5% os genes *fnbA* e *fnbB* e 57,2% o gene *cna*.

Com os resultados encontrados pelos autores citados podemos observar que estão em concordância com os valores obtidos nesta pesquisa, na qual foi observada a prevalência do gene *eno* na maioria dos isolados.

Tabela 5 – Resultados da frequência relativa da presença dos genes nos isolados de laticínios e de leite de vacas com mastite pelo teste de Q de Cochran

Genes		N° de isolados	%
<i>clfA</i>	-	10	6,7
	+	140	93,3^C
<i>eno</i>	-	19	12,7
	+	131	87,3^B
<i>ebpS</i>	-	56	37,3
	+	94	62,7^B
<i>fib</i>	-	68	45,3
	+	82	54,7^B
<i>fnbA</i>	-	69	46,0
	+	81	54,0^B
<i>icaD</i>	-	70	46,7
	+	80	53,3^B
<i>ica A</i>	-	79	52,7
	+	71	47,3^B
<i>clfB</i>	-	79	52,7
	+	71	47,3^B
<i>fnbB</i>	-	85	56,7
	+	65	43,3^B
<i>bap</i>	-	124	82,7
	+	26	17,3^A
<i>cna</i>	-	138	92,0
	+	12	8,0^A
<i>bbp</i>	-	144	96,0
	+	6	4,0^A

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do AVC e a presença de genes de acordo com a origem obtidos dos isolados avaliados.

Tabela 6 – Presença (+) e ausência (-) de genes de acordo a origem dos isolados

Origem	AVC		icaA		icaD		bap		fnbA		fnbB		clfA		clfB		bbp		eno		fib		cna		ebpS	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Leite cru (n=30)	14	16	22	8	23	7	1	29	23	7	17	13	30	0	21	9	4	26	28	2	23	7	7	23	25	5
Embaladeira (n=1)	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
Forma (n=1)	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	
Leite pasteurizado (n=1)	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
Manipulador (n=26)	3	23	2	24	2	24	0	26	2	24	7	19	19	7	2	24	0	26	24	2	2	24	0	26	3	23
Mesa (n=3)	2	1	0	3	0	3	0	3	1	2	3	0	3	0	2	1	0	3	3	0	2	1	0	3	2	1
Piso (n=1)	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
Queijo antes da embalagem (n=8)	3	5	4	4	5	3	1	7	5	3	4	4	8	0	4	4	1	7	6	2	7	1			4	4
Queijo depois da embalagem (n=24)	8	16	16	8	18	6	1	23	16	8	9	15	23	1	16	8	0	24	20	4	12	12	5	19	21	3
Salmoura (n=8)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0	2	0	2	1	1	1	1	0	2	1	1
Tanque (n=4)	2	2	0	4	2	2	0	4	3	1	3	1	4	0	1	3	0	4	4	0	2	2	0	4	1	3
Leite de vacas com mastite (n=49)	22	27	24	25	27	22	34	15	28	21	17	32	47	2	23	26	0	49	42	7	30	19	0	49	34	15
TOTAL (n=150)	58	92	71	77	80	68	37	108	81	69	65	85	140	10	71	79	6	144	131	19	82	68	12	130	94	56

6.2.2 Frequência relativa da presença de genes e de isolados positivos no AVC

Nos 150 isolados que foram testados (Figura 9), a relação entre os isolados positivos ao AVC e a frequência relativa da presença de genes, mostrou que a frequência dos isolados positivos ao AVC foi significativamente maior que a frequência dos genes: *bap*, *cna* e *bbp*, menor que dos genes *clfA*, *eno* e *ebpS* e igual que aos genes *fib*, *fnbA*, *icaD*, *icaA*, *clfB*, *fnbB* ($p < 0,0001$).

Figura 9 - Frequência relativa da presença de genes e isolados positivos ao teste do AVC nos 150 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de laticínio e de leite de vaca com mastite subclínica

Uma pesquisa realizada na região de Pernambuco testou 210 isolados de *Staphylococcus* spp provenientes de mastite subclínica. Foi observado que 3,7 % dos isolados foram positivos no AVC, enquanto que o gene *icaD* foi detectado em 92,2 % de cepas (KREWER et al., 2015), resultados que diferem dos obtidos na presente pesquisa.

Com base na origem dos isolados foi determinada a frequência relativa dos isolados positivos no AVC, e a presença de genes nos 101 isolados provenientes de laticínios (Figura 10) e nos 49 isolados provenientes de leite de vaca com mastite subclínica (Figura 11).

Nos 101 isolados de laticínios (Figura 10), a relação entre os isolados positivos ao AVC e a frequência relativa da presença de genes, mostrou que o AVC foi significativamente maior que a frequência dos genes *cna*, *bbp* e *bap*, menor que os

genes *clfA* e *eno* e igual a frequência dos genes *ebpS*, *icaD*, *fib*, *clfB*, *fnbB* e *icaA* ($p < 0,0001$).

*Isolados positivos ao teste do AVC

Figura 10 - Frequência relativa da presença de genes e isolados positivos ao teste do AVC nos 101 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de laticínio

Nos 49 isolados de leite de vacas com mastite subclínica (Figura 11), a relação entre os isolados positivos ao AVC e a frequência da presença de genes, mostrou que o AVC foi significativamente maior que a frequência do gene *fnbB* e igual à frequência dos genes: *fib*, *fnbA*, *icaD*, *icaA*, *bap* e *clfB*. Os genes *bbp* e *cna* não foram encontrados nos isolados testados ($p < 0,0001$).

Almeida et al. (2013) trabalharam com 18 isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica e não observaram a presença dos genes *bbp* e *cna*. Na área médica o *bbp* e *cna* são genes comumente identificados em isolados clínicos de infecções hospitalares em humanos (ZHANG et al., 2015; CAMPOCCIA et al., 2009; TANEIKE et al., 2006)

*Isolados positivos ao teste do AVC

Figura 11 - Frequência relativa da presença de genes e isolados positivos ao teste do AVC nos 49 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de vaca com mastite subclínica

A mastite é a doença mais comum e prejudicial em gado leiteiro e tem um grande impacto econômico sobre a produção e qualidade do leite e produtos lácteos, sendo o *S. aureus*, um dos agentes causadores mais importantes de mastite subclínica no mundo (SILVA et al., 2012; HALASA et al., 2007; FREITAS, 2005).

Quanto às espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. hyicus* e *S. haemolyticus* são as mais comuns associadas à mastite estafilocócica clínica ou subclínica (BERTELLONI et al., 2015).

A pesquisa realizada por Melo (2008), utilizando 94 isolados de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, mostrou que a capacidade produção de biofilmes identificada no AVC pela presença de colônias pretas foi de 85%. Na mesma pesquisa, verificou-se que 95,7% dos isolados possuíam os genes *icaA* e *icaD*.

Dhanawade et al. (2010) avaliaram 102 isolados provenientes de mastite subclínica de vacas da Índia observaram que 48,03% dos isolados foram positivos no AVC, enquanto que 35,29% dos isolados possuíam os genes *icaA* e *icaD*.

Na presente pesquisa de acordo com a espécie foi determinada a frequência relativa dos isolados positivos no AVC, e a presença de genes nos 131 isolados de *S. aureus* provenientes de laticínios e de leite de vaca com mastite subclínica (Figura 12).

A relação entre os isolados positivos ao AVC e a frequência da presença de genes nos 131 isolados, mostrou que o AVC foi maior que a frequência dos genes: *bap*, *cna* e *bbp*, menor que a frequência dos genes *clfA*, *eno*, *ebpS*, *fib*, *fnbA* e *icaD* e igual à frequência dos genes *icaA*, *clfB*, *fnbB* ($p < 0,0001$).

*Isolados positivos ao teste do AVC

Figura 12 - Frequência relativa da presença de genes e isolados positivos ao teste do AVC nos 131 isolados de *S. aureus* provenientes de laticínio e leite de vacas com mastite subclínica

Viana et al. (2003) avaliaram 69 isolados de *S. aureus* provenientes de lesões purulentas crônicas em coelhos e obtiveram 94,2 % de positividade para o gene *cna*, 75,4% para *bbp* e 59,4% para *fnbB*, mostrando que o gene *fnbB* apresentou similar frequência que a presente pesquisa.

Uma avaliação fenotípica e genotípica de 46 isolados de *S. aureus*, provenientes de pacientes com infecção auricular utilizou AVC e PCR em amostras recolhidas ao longo de um período de 10 meses. O teste do AVC mostrou que 56,5 % dos isolados foram positivos, enquanto que na análise genotípica por PCR obtiveram 78,26% dos isolados positivos para a presença dos genes *icaA* e *icaD*, 46,1 % para o gene *fnbA*, 56,5% para o gene *cna* e 30,4% para o gene *clfA* (ZMANTAR et al., 2008), evidenciando que a frequência de genes para formação de biofilmes depende da cepa e é importante considerar que algumas cepas são hospedeiro específicas.

6.2.3 Perfis genotípicos dos isolados

A partir dos genes obtidos para cada um dos 150 isolados provenientes de laticínios e de leite de vacas com mastite subclínica foram encontrados 47 perfis genotípicos diferentes para *S. aureus* (Tabela 7). Nas outras espécies foram obtidos 3 perfis genotípicos diferentes nos isolados de *S. epidermidis*, 2 do *S. warneri*, 7 do *S. hyicus* e 2 de *S. xilosus*. O isolado de *S. chromogenes* não apresentou nenhum dos genes pesquisados (Tabela 8).

Considerando-se a origem dos isolados, todos os perfis genotípicos obtidos na presente pesquisa são apresentados no apêndice B. A Tabela 21 apresenta os perfis genotípicos dos isolados coletados de leite de vacas com mastite subclínica e a Tabela 22 apresenta-se os perfis genotípicos dos isolados provenientes de laticínios.

O gene *bap* esteve presente em três isolados dentro do laticínio (apêndice 2.2). O primeiro isolado foi de uma amostra de leite cru (isolado 100). O segundo isolado foi de queijo antes da embalagem-QA (isolado 69) e o terceiro isolado foi de queijo depois da embalagem-QD (isolado 72). O gene *bap* é associado a *Staphylococcus* spp presentes em vacas com mastite. Os resultados sugerem que patógenos com este gene ingressam no laticínio pelo leite cru, uma vez que o patógeno positivo para esse gene foi isolado de leite cru (isolado 100). Sabe-se que *Staphylococcus* spp. são destruídos por processo de pasteurização, portanto, isolados com genes específicos de leite de vacas com mastite, como o *bap*, não deveriam estar presentes após o processo de pasteurização, como foi observado.

Tabela 7 - Perfis genotípicos dos 131 isolados de *S. aureus* provenientes de laticínios e leite de vacas com mastite subclínica

Nº isolados	Perfil genotípico
13	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
13	<i>eno clfA</i>
11	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
11	<i>eno fnbB clfA</i>
9	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
7	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno clfB clfA</i>
6	<i>icaA icaD ebpS fnbA cna eno fib clfB clfA</i>
5	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
4	<i>icaA icaD ebpS fnbA cna eno fib clfB fnbB clfA</i>
3	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
3	<i>Eno</i>
2	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp eno fib clfB fnbB clfA</i>
2	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
2	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
2	<i>ebpS eno fib clfB fnbB clfA</i>
2	<i>ebpS eno fib fnbB clfA</i>
2	<i>fnbB clfA</i>
2	<i>clfA</i>
1	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp cna eno fib clfB fnbB clfA</i>
1	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
1	<i>icaD bap ebpS fnbA eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaA bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
1	<i>icaA icaD ebpS fnbA fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaD bap ebpS fnbA eno fib clfA</i>
1	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno clfA</i>
1	<i>icaA icaD fnbA eno fib clfB clfA</i>
1	<i>icaD fnbA eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaD bap eno fib clfB clfA</i>
1	<i>bap ebpS eno fib clfA</i>
1	<i>ebpS eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>ebpS cna eno fnbB clfA</i>
1	<i>icaD fnbA fib fnbB clfA</i>
1	<i>icaD bap ebpS fib clfA</i>
1	<i>icaD bap ebpS fib clfA</i>
1	<i>ebpS fnbA eno clfA</i>
1	<i>eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>fnbA eno fnbB clfA</i>
1	<i>fnbA eno fib clfA</i>
1	<i>icaD fnbA eno clfA</i>
1	<i>bap ebpS eno clfA</i>
1	<i>bbp fib fnbB clfA</i>
1	<i>ebpS eno clfA</i>
1	<i>ebpS eno clfA</i>
1	<i>icaD clfA</i>
1	<i>ebpS clfA</i>

Nos 8 isolados de ECN (6 de *S. epidermidis* e 2 de *S. warneri*), provenientes de laticínio e leite de vacas com mastite subclínica testados, observou-se ausência dos genes *icaA* e *icaD* (Tabela 8). Já em Tuscan (Itália), Bertelloni et al. (2015) trabalharam com 74 isolados de ECN provenientes de leite de vacas de 3 laticínios e

observaram que 20,3% dos isolados possuíam os genes *icaA* e *icaD*, foram testados poucos isolados de ECN na presente pesquisa.

Tabela 8 - Perfis genotípicos dos 19 isolados das outras espécies de *Staphylococcus* provenientes de laticínios e de leite de vacas com mastite subclínica

Nº de isolados/ espécie	Perfil genotípico
<i>S. epidermidis</i>*	
3	<i>eno clfA</i>
1	<i>Eno</i>
1	<i>eno fnbB clfA</i>
1	0 genes
<i>S. warneri</i>*	
1	<i>ebpS eno fnbB clfA</i>
1	<i>Eno</i>
<i>S. hycus</i>**	
2	<i>clfA</i>
1	<i>ebpS eno fib fnbB clfA</i>
1	<i>ebpS bbp fnbB clfA</i>
1	<i>ebpS fnbB clfA</i>
1	<i>eno fnbB clfA</i>
1	<i>ebpS eno</i>
1	<i>ebpS</i>
<i>S. xilosus</i>**	
1	<i>eno clfA</i>
1	<i>Eno fnbB clfA</i>
<i>S. chromogenes</i>**	
1	0 genes

*ECN= *Staphylococcus* coagulase negativa, **ECP= *Staphylococcus* coagulase positiva

6.3 Seleção de cepas utilizadas na quantificação de biofilmes

Dentre as 10 cepas selecionadas (Tabela 9), 4 eram da espécie *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica, sendo duas positivas e duas negativas para o AVC: a primeira cepa (+) possuía os genes *icaA*, *icaD* e *bap*; a segunda (+), os genes *icaA* e *bap*; a terceira (-) os genes *icaD* e *bap* e a quarta (-) o gene *bap*. Das outras 6 cepas provenientes de laticínios, 4 eram da espécie *S. aureus*, sendo três positivas e uma negativa ao teste do AVC: a primeira cepa (+) possuía genes *bbp*; a segunda (-) os genes *icaA*, *icaD*, *bbp* e *cna*; a terceira (-) os genes *icaD*, *icaD* e *cna* e a quarta (+) o gene *icaD*. As últimas duas cepas dos laticínios foram da espécie *S. epidermidis*, sendo selecionadas uma positiva e uma negativa ao teste do AVC. Foram também avaliadas três cepas padrão: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228, cuja seleção foi explicada na metodologia no item 5.4 (Seleção das cepas para quantificação de biofilmes)

Tabela 9 - Cepas selecionadas para quantificação de biofilmes e respectivas características

Código	AVC	Cor	Procedência	Espécie	Coa	Perfil genotípico
47F	+	Preta	LVM	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
85F	+	Preta	LVM	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaA bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
79F	-	Vermelho	LVM	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaD bap ebpS fnbA eno fib clfA</i>
141F	-	Vermelho claro	LVM	<i>S. aureus</i>	+	<i>bap ebpS eno fib clfA</i>
47	+	Muito preta	QA	<i>S. aureus</i>	+	<i>bbp fib fnb B clf A</i>
119	+	Preta	Leite cru	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp cna eno fib clfB fnbB clfA</i>
79	-	Vermelho escura	QD	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaA icaD ebpS fnbA cna eno fib clfB fnbB clfA</i>
330	+	Cinza escura	Tanque	<i>S. aureus</i>	+	<i>icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
201	-	Vermelho	Manipulador	<i>S. epidemidis</i>	-	<i>eno fnbB clfA</i>
202	+	Cinza escuro	Manipulador	<i>S. epidemidis</i>	-	<i>eno clfA</i>

AVC= Agar Vermelho Congo, Coa = Coagulase, LVM= Leite de vacas com mastite subclínica, QA = Queijo antes da embalagem, QD= queijo depois da embalagem

6.4 Quantificação do biofilme

A variável de resposta Densidade óptica não apresentou normalidade ($p < 0,05$) para nenhuma das cepas avaliadas (Tabela 10), enquanto a contagem microbiológica das cepas 119, 47, 330, 47F, 85F, 202, ATCC 6538, ATCC 35984, ATCC 12228 apresentou normalidade ($p > 0,05$). Pelo teste de Levene (Tabela 11) observa-se que a densidade óptica não apresentou homogeneidade de variâncias ($p < 0,000$), enquanto a contagem microbiológica apresentou Homogeneidade de variâncias ($p = 0,307$).

Tabela 10 - Normalidade pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov^a com a correção de Lilliefors

Cepas	Kolmogorov-Smirnov ^a (Significância)	
	Densidade Óptica (600 nm)	Contagem microbiológica (log ₁₀ UFC m ⁻²)
119	<0,000	0,200
47	<0,000	0,200
79	0,002	<0,000
330	<0,000	0,114
47 F	0,004	0,083
85 F	<0,000	0,151
79 F	<0,000	<0,000
141 F	<0,000	0,008
201	0,004	0,011
202	<0,000	0,200
ATCC 6538	<0,001	0,200
ATCC 35984	<0,000	0,200
ATCC 12228	<0,000	0,038

^a Correção de Lilliefors

Tabela 11 - Homogeneidade de variâncias pelo Teste de Levene

Variáveis	Graus de liberdade	Significância
Densidade Óptica	12	<0.000
Contagem UFC.cm ⁻²	12	0.307

Para as variáveis de resposta, densidade óptica e contagem microbiológica (Tabela12), os fatores cepa, temperatura, superfície e as interações cepa x temperatura, temperatura x superfície foram significativos ($p < 0,05$). Para densidade óptica as interações: cepa x superfície, cepas x temperatura x superfície e cepas x temperatura x tempo x superfície, foram significativas ($p < 0,05$). Para a contagem microbiológica as interações: cepas x temperatura x tempo e temperatura x tempo x superfície foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Resultados do Teste de Friedman ($p < 0,05$) para as variáveis de resposta densidade óptica (DO) e contagem microbiológica

Fatores	Densidade óptica (600 nm)	Contagem microbiológica (log ₁₀ UFC m ⁻²)
Cepas	< 0,0001	< 0,0001
Tempo	0,24	0,07
Temperatura	< 0,0001	< 0,0001
Superfície	< 0,0001	< 0,0001
Cepas x Temperatura	< 0,0001	< 0,0001
Cepas x Tempo	0,92	0,55
Cepas x Superfície	< 0,0007	0,07
Temperatura x Tempo	0,95	0,56
Temperatura x Superfície	< 0,03	< 0,0001
Tempo x Superfície	0,59	0,09
Cepas x Temperatura x Tempo	0,58	0,0087
Cepas x Temperatura x Superfície	< 0,0005	0,17
Cepas x Tempo x Superfície	0,03	0,25
Temperatura x Tempo x Superfície	0,23	< 0,04
Cepas x Temperatura x Tempo x Superfície	0,02	0,41

6.4.1 Densidade óptica

A média da densidade óptica (Tabela 13) mostrou diferença significativa entre as cepas ($p < 0,0001$), sendo que a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou a maior formação de biofilme, seguido pela cepa 119. Essas duas cepas apresentaram maior formação de biofilme provavelmente porque elas possuíam genes associados a formação de biofilmes. A cepa 119 isolada em leite cru possui 11 dos 12 genes pesquisados (Tabela 9) relacionados a formação de biofilme. As cepas 202 (*S. epidermidis*) e 47 (*S. aureus*) não possuindo os genes comumente associados a formação de biofilme (*ica A*, *icaD* e *bap*) apresentaram considerável formação de biofilme isso indica que a formação de biofilmes não é exclusivamente dependente desses genes e pode estar relacionado a outros mecanismos promovidas pelas adesinas presentes nessas cepas (Tabela 9). O gene *bbp* presente na cepa 47 isolada em queijo antes da embalagem poderia indicar que é um *S. aureus* proveniente de humano já que esse gene é associado a infecções hospitalares (ZHANG et al., 2015).

Tabela 13 - Média da densidade óptica das cepas avaliadas

Cepas	Origem das cepas	Espécie	Classificação das médias*	Média da DO (600 nm)
ATCC 35984	Control (+)	<i>S. epidermidis</i>	9,89	0,86±0,17 ^C
119	Leite cru	<i>S. aureus</i>	9,31	0,44±0,08 ^{BC}
202	Manipulador	<i>S. epidermidis</i>	7,72	0,45±0,10 ^{ABC}
47	QA	<i>S. aureus</i>	7,53	0,34±0,06 ^{ABC}
ATCC 6538	Control (+)	<i>S. aureus</i>	7,18	0,28±0,05 ^{ABC}
79 F	LVM	<i>S. aureus</i>	6,89	0,29±0,05 ^{ABC}
141 F	LVM	<i>S. aureus</i>	6,85	0,31±0,08 ^{AB}
330	Tanque	<i>S. aureus</i>	6,61	0,24±0,04 ^{AB}
47 F	LVM	<i>S. aureus</i>	6,40	0,24±0,04 ^{AB}
85 F	LVM	<i>S. aureus</i>	6,01	0,28±0,07 ^A
201	Manipulador	<i>S. epidermidis</i>	5,82	0,18±0,03 ^A
ATCC 12228	Control (-)	<i>S. epidermidis</i>	5,65	0,20±0,03 ^A
79	QD	<i>S. aureus</i>	5,14	0,15±0,02 ^A

*Teste Friedman ($\alpha = 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna. LVM= Leite de vacas com mastite subclínica, QA = Queijo antes da embalagem, QD= queijo depois da embalagem

As células bacterianas têm geralmente uma carga negativa na sua parede celular, em pH 7,0 (RIJNAARTS et al., 1999). No entanto, a magnitude da carga varia

entre as espécies e geralmente é influenciada pelas condições da cultura, a fase da cultura, força iônica e o pH (DIAZ, 2011). As cepas de *S. epidermidis* (ATCC 35984 e 202) apresentaram maior formação de biofilme que as cepas de *S. aureus* (330, 47F, 85F e 79).

Dobinsky et al. (2003), avaliando cepas de *S. epidermidis* com presença dos genes *icaA* e *icaD*, obtiveram maior densidade óptica nos ensaios de quantificação de biofilme em micro placa de poliestireno, indicando maior formação de biofilme nas cepas com presença desses genes. Comparando-se com os resultados desta pesquisa, a cepa ATCC35984, que possui os genes *icaA*, *icaD*, apresentou maior densidade que as cepas 201 e 202, que não possuíam esses genes.

Siljamäki et al. (2014), comparando a produção de adesinas segregadas por 3 cepas de *S. epidermidis*, sendo uma de mastite bovina (PM 221) e duas humanas de tipo comensais (ATCC 12228 e RP62A), mostraram que a produção de adesinas entre as cepas foi similar, mas a patogenidade da cepa PM221 foi maior.

A média da densidade óptica dos tempos avaliados, de 12,48 e 96 h (Tabela 14), não apresentou diferença significativa ($p=0,24$), independentemente das cepas avaliadas. Nas Tabelas 15 e 16, observa-se que as variáveis temperatura e tipo de superfície apresentaram diferença significativa ($p<0,0001$).

Tabela 14 - Média da densidade óptica (DO) no fator tempo

Tempo	Classificação das médias*	Média da DO (600 nm)
48 h	2,10	0,34±0,04 ^A
96 h	1,98	0,35±0,04 ^A
12 h	1,92	0,29±0,04 ^A

*Teste Friedman ($\alpha=0,05$). Diferenças significativas ($p<0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

A dispersão bacteriana pode ocorrer naturalmente durante o desenvolvimento dos biofilmes no meio ambiente, o que pode ser explicado pelo esgotamento de nutrientes ou pelo acúmulo de resíduos tóxicos, bem como pela presença de enzimas que favorecem a ruptura do biofilme (KARATAN; WATNICK, 2009; LE et al., 2014). Tal fato pode explicar os resultados observados na Tabela 14, uma vez que não houve diferença significativa ($p=0,24$) entre os diferentes tempos de avaliação na formação de biofilme. Provalmente após 48 horas de incubação houve esgotamento de nutrientes e os micro-organismos cessaram seu crescimento.

Kaplan (2010) e Winkelströter et al. (2014), mencionam que a dispersão de biofilmes geralmente ocorre devido a mecanismos ativos ou passivos. Os mecanismos ativos estão associados com a presença de estruturas bacterianas ou com a produção de substâncias extracelulares como por exemplo, as enzimas e moléculas de sinalização. Os ativos são mediados por forças externas a por diferentes processos: (1) corte ou erosão, que se refere à eliminação contínua de células individuais ou pequenos grupos de células a partir de uma película a níveis baixos ao longo da formação de biofilme; (2) descamação, que refere-se a remoção rápida e maciça de grandes porções de biofilme, geralmente durante os últimos estágios de formação e (3) abrasão, a qual se refere ao descolamento devido a colisão de partículas sólidas com o biofilme. Tais fenômenos citados pelos autores acima poderiam justificar os resultados obtidos, onde não foi encontrada diferença significativa nos três tempos avaliados na presente pesquisa.

A temperatura (Tabela 15) apresentou uma relação diretamente proporcional à formação de biofilme independentemente das cepas avaliadas, sendo que a 25°C a média da densidade óptica foi quase o dobro da encontrada para a temperatura de 5°C.

Tabela 15 - Média da densidade óptica (DO) no fator temperatura

Temperatura	Classificação das médias*	Média da DO (600 nm)
25°C	1,63	0,42±0,04 ^B
5°C	1,37	0,23±0,02 ^A

*Teste Friedman ($\alpha = 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

Esses resultados eram esperados uma vez que a temperatura avaliada de 25°C é mais próxima da temperatura ótima de crescimento do micro-organismo que é de 37°C (BAIRD-PARKER, 1990; KLOOS; BANNERMAN, 2003).

Abdallah et al. (2015) avaliaram o efeito da temperatura de crescimento (20, 30 e 37°C) e o tipo de superfície (aço inoxidável e policarbonato), sobre a resistência do biofilme a desinfetantes em *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Observaram uma relação direta entre a formação de biofilme e a temperatura e observaram maior formação a 37°C quando comparando as outras temperaturas ($p < 0,05$).

Na Tabela 16, observou-se que para o fator superfície a média da densidade óptica apresentou diferença significativa entre as superfícies independente das cepas avaliadas, sendo que a produção de biofilme em aço inoxidável foi o quádruplo da encontrada para o polipropileno.

Tabela 16 - Média da densidade óptica no fator superfície

Superfície p<0,0001	Classificação das médias*	Média da DO (600 nm)
Aço inoxidável	1,94	0,55± 0,04 ^B
Polipropileno	1,06	0,11± 0,02 ^A

*Teste Friedman ($\alpha = 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

Existem materiais com alta energia superficial, tais como o aço inoxidável, o ouro e outros, enquanto que as resinas possuem baixa energia superficial. A elevada energia da superfície ou a presença de substrato favorece a hidrofiliabilidade, enquanto que a baixa energia de superfície a torna hidrofóbica (DIAZ, 2011). Como observado na presente pesquisa o aço inoxidável foi a superfície que apresentou maior formação de biofilme, independentemente de cepa avaliada e da temperatura. Observou-se que a formação de biofilme em aço inoxidável a 5°C foi maior que em polipropileno a 25°C. Como foi discutido, o aço inoxidável possui maior energia superficial e a maior hidrofiliabilidade o que favorece a adesão celular.

As interações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre cepa x temperatura, cepa x superfície e temperatura x superfície podem ser observadas nas Figuras 13, 14 e 15.

As cepas 119, 47F, 85F, 79F, 141F, 202, ATCC12228, ATCC6538 e ATCC35984 apresentaram maior formação de biofilme na temperatura de 25°C. As cepas 47, 201 e 330 apresentaram maior formação de biofilme a 5°C. Enquanto que a cepa 79 apresentou o mesmo comportamento nas duas superfícies (Figura 13).

(a) *S. aureus*, (b) *S. epidermidis*

Figura 13 - Média da densidade óptica (DO) para a interação cepas x temperatura

A média da densidade óptica para a interação cepa x superfície para o aço inoxidável foi significativamente maior ($p < 0,0007$) que para o polipropileno para todas as cepas avaliadas (Figura 14).

(a) *S. aureus*, (b) *S. epidermidis*

Figura 14 - Média da densidade óptica (DO) para a interação cepas x superfície

A média da densidade óptica para a interação dos fatores temperatura x superfície independentemente da cepa avaliada (Figura 15) apresentou diferença significativa ($p < 0,03$).

Figura 15 - Média da densidade óptica (DO) para a interação temperatura x superfície

Vázquez-Sánchez et al. (2013) mostraram que a adesão bacteriana às superfícies está diretamente correlacionada com a hidrofobicidade da superfície celular. De acordo com seus resultados, todas as estirpes de *S. aureus* expressaram hidrofobia moderada, sugerindo uma adesão inicial inferior no poliestireno hidrofóbico quando comparado com superfícies hidrofílicas tais como o vidro.

Mafu et al. (2010) também relataram uma hidrofobia moderada e uma baixa tendência para união do *S. aureus* ao poliestireno. O que corrobora a menor formação de biofilme no polipropileno na presente pesquisa.

6.4.2 Contagem microbiológica pela metodologia da micro-gota

As médias da contagem microbiológica das cepas avaliadas apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,001$), sendo que a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 apresentou numericamente a maior contagem e a cepa 141F apresentou a menor contagem (Tabela 17).

Entretanto a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 não diferiu estatisticamente das cepas 47, ATCC 6538, 202, 119, 79 e 47F, 201 e 330 constituindo assim tais cepas em um grupo. Igualmente, outro grupo se formou com as cepas 85F, 79F e ATCC 12228, cujas cepas não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

As cepas apresentaram contagem na faixa entre 6,5 e 7,6 Log_{10} UFC m^{-2} , estando em concordância com Marques et al. (2007) e Zottola; Sasahara (1994), os quais relatam que para que aconteça a formação de biofilme o número de células aderidas deve variar entre log 6 e log 7 UFC cm^{-2} , sendo que valores inferiores a esta faixa indicariam apenas um processo de aderência.

Tabela 17 - Média da contagem microbiológica das cepas avaliadas

Cepas	Espécie	Origem das cepas	Classificação das médias*	Média da contagem (log_{10} UFC m^{-2})
ATCC 35984	<i>S. epidermidis</i>		9,03	7,60 $\pm$ 0,17 ^C
47	<i>S. aureus</i>	QA	9,00	7,46 $\pm$ 0,13 ^C
ATCC 6538	<i>S. aureus</i>		8,79	7,52 $\pm$ 0,15 ^C
202	<i>S. epidermidis</i>	Manipulador	8,60	7,49 $\pm$ 0,15 ^C
119	<i>S. aureus</i>	Leite cru	8,60	7,43 $\pm$ 0,14 ^C
79	<i>S. aureus</i>	QD	8,00	7,39 $\pm$ 0,16 ^C
47 F	<i>S. aureus</i>	LVM	7,99	7,29 $\pm$ 0,15 ^C
201	<i>S. epidermidis</i>	Manipulador	7,07	7,30 $\pm$ 0,15 ^{BC}
330	<i>S. aureus</i>	Tanque	6,71	7,21 $\pm$ 0,18 ^{BC}
85 F	<i>S. aureus</i>	LVM	4,86	6,95 $\pm$ 0,13 ^{AB}
79 F	<i>S. aureus</i>	LVM	4,80	6,88 $\pm$ 0,17 ^{AB}
ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i>		4,60	6,82 $\pm$ 0,16 ^{AB}
141 F	<i>S. aureus</i>	LVM	2,96	6,52 $\pm$ 0,15 ^A

*Teste Friedman ($\alpha = 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna. LVM= Leite de vacas com mastite subclínica, QA = Queijo antes da embalagem, QD= queijo depois da embalagem

As médias da contagem microbiológica para os tempos de 12, 48 e 96 horas (Tabela 18) independentemente da cepa avaliada não diferiram estatisticamente entre si ($p=0,07$).

Tabela 18 - Média da contagem microbiológica no fator tempo

Tempo (horas)	Classificação das médias*	Média da contagem (log₁₀ UFC m⁻²)
48	2,07	7,27±0,08 ^A
12	1,97	7,20±0,08 ^A
96	1,96	7,19±0,07 ^A

*Teste Friedman ($\alpha =0,05$). Diferenças significativas ($p <0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

As médias da contagem microbiológica para as temperaturas de 5 e 25°C (Tabela 19) apresentaram diferença significativa entre si ($p<0,0001$). O fator temperatura apresentou uma relação diretamente proporcional à formação de biofilme, sendo que a 25°C a média da contagem foi estatisticamente maior que a obtida para a temperatura de 5°C.

Tabela 19 - Média da contagem microbiológica no fator temperatura

Temperatura (°C)	Classificação das médias*	Média da contagem (log₁₀ UFC m⁻²)
25	1,85	7,68±0,05 ^B
5	1,15	6,76±0,06 ^A

*Teste Friedman ($\alpha =0,05$). Diferenças significativas ($p <0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

As médias da contagem microbiológica para o aço inoxidável e polipropileno (Tabela 20) apresentaram diferença significativa entre si ($p<0,0001$).

Tabela 20 - Média da contagem microbiológica no fator superfície

Superfície	Classificação das médias*	Média da contagem (log₁₀ UFC m⁻²)
Aço inoxidável	1,85	7,71±0,04 ^B
Polipropileno	1,15	6,73±0,06 ^A

*Teste Friedman ($\alpha =0,05$). Diferenças significativas ($p <0,05$) são indicadas por letras diferentes na mesma coluna

As interações: cepas x temperatura e temperatura x superfície que foram estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) podem ser observadas nas Figuras 16 e 17.

As médias da contagem microbiológica das cepas (Figura 16) na temperatura de 5°C ficou na faixa entre 6 e 7 ($\log_{10}\text{UFC cm}^{-2}$), enquanto a contagem a 25°C ficou na faixa entre 7 e 8 ($\log_{10}\text{UFC cm}^{-2}$).

(a) *S. aureus*, (b) *S. epidermidis*

Figura 16 - Média da contagem microbiológica para a interação cepas x temperatura

As médias da contagem microbiológica para a interação dos fatores temperatura x superfície (Figura 17) apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,0001$).

Como aconteceu com a método do cristal violeta de quantificação de biomassa de biofilme (densidade óptica), a contagem microbiológica mostrou que o aço inoxidável foi a superfície com maior adesão pois observou-se contagens superiores a 1 log quando comparadas com o polipropileno. Também na temperatura de 25°C foram obtidas as maiores contagens microbiológicas, com 1 log de diferença quando comparadas com as contagens a 5°C.

Figura 17 - Média da contagem microbiológica para a interação temperatura x superfície

6.5 Morfologia dos biofilmes pela MEV

Para observar a morfologia dos biofilmes foram selecionadas 6 cepas: *S. aureus* ATCC 6538 (control positivo), *S. epidermidis* ATCC12228 (control negativo), *S. epidermidis* ATCC 35984 (control positivo), *S. aureus* 119, *S. aureus* 47F e *S. epidermidis* 202. Observou-se biofilmes formados nas duas superfícies avaliadas - aço inoxidável e polipropileno - os quais foram produzidos em duas temperaturas (5 e 25°C) e dois tempos (12h e 96h).

A observação das 48 amostras foi realizada mediante MEV, conforme apresentado nas Figuras 18 a 25. Foi observada formação de biofilmes com todas as cepas avaliadas. A maior formação de biofilme foi observada em aço inoxidável a 25°C, corroborando os resultados das duas metodologias usadas nesta pesquisa, como o cristal violeta (DO) e a contagem microbiológica ($\log_{10}$ UFC cm^{-2}).

A cepa ATCC 35984, de acordo com as micrografias, foi a que apresentou maior formação de biofilme. Tem sido relatado que 99% de todas as células bacterianas existem como biofilmes e apenas 1% como células planctônicas (DIAZ, 2011; MORRIS; STICKLER; MCLEAN, 1999; SINGH et al., 2000). Tal fato também foi observado na presente pesquisa. Assim, o comportamento de formação de biofilmes

tem considerável importância na avaliação da sobrevivência dos procariontes nos ambientes naturais ou industriais, assim como em superfícies bióticas.

Cepa 119 (*S.aureus*), 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa 119 (*S.aureus*), 5°C, 12 h, Polipropileno

Cepa 119(*S.aureus*), 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa 119 (*S.aureus*), 5°C, 96 h, Polipropileno

Cepa 47F (*S.aureus*), 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa 47F (*S.aureus*), 5°C, 12 h, Polipropileno

Figura 18 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 5°C das cepas 119 e 74F

Ceba 47F (*S.aureus*), 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Ceba 47F (*S.aureus*), 5°C, 96 h, Polipropileno

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 5°C, 12 h, Polipropileno

Ceba 202(*S. epidermidis*), 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 5°C, 96 h, Polipropileno

Figura 19 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 5°C das cepas 74F e 202.

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 5°C, 12 h, Polipropileno

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 5°C, 96 h, Polipropileno

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 5°C, 12 h, Polipropileno

Figura 20 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 5°C das cepas ATCC 35984 e ATCC 12228

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 5°C, 96 h, Polipropileno

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 5°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 5°C, 12 h, Polipropileno

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 5°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 5°C, 96 h, Polipropileno

Figura 21 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 5°C das cepas ATCC 35984 e ATCC 6538

Ceba 119 (*S. aureus*), 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Ceba 119 (*S. aureus*), 25°C, 12 h, Polipropileno

Ceba 119 (*S. aureus*), 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Ceba 119 (*S. aureus*), 25°C, 96 h, Polipropileno

Ceba 47F (*S. aureus*), 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Ceba 47F (*S. aureus*), 25°C, 12 h, Polipropileno

Figura 22 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 25°C das cepas 119 e 47F

Ceba 47F (*S. aureus*), 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Ceba 47F (*S. aureus*), 25°C, 96 h, Polipropileno

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 25°C, 12 h, Polipropileno

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Ceba 202 (*S. epidermidis*), 25°C, 96 h, Polipropileno

Figura 23 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 25°C das cepas 47F e 202

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 25°C, 12 h, Polipropileno

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 35984, 25°C, 96 h, Polipropileno

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 25°C, 12 h, Polipropileno

Figura 24 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 25°C das cepas ATCC 35984 e ATCC 12228

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, 25°C, 96 h, Polipropileno

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 25°C, 12 h, Aço inoxidável

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 25°C, 12 h, Polipropileno

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 25°C, 96 h, Aço inoxidável

Cepa *S. aureus* ATCC 6538, 25°C, 96 h, Polipropileno

Figura 25 - Microfotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a formação de biofilme em cupons de aço inoxidável e de polipropileno incubados por 12 e 96 horas a 25°C das cepas ATCC 12228 e ATCC 6538

7 CONCLUSÕES

Os resultados observados no presente trabalho indicam que existe grande diversidade de *Staphylococcus* spp. nos laticínios e nas fazendas leiteiras avaliadas.

Pelo teste do AVC, dos 150 isolados de *Staphylococcus* spp., 38,7% foram positivos para a formação de biofilme. Nos 150 isolados foi identificado pelo menos um dos 12 genes relacionados à formação de biofilmes, sendo que 93,5% dos isolados apresentaram o gene *clfA*, 87,3% o *eno*, 62,7% o *ebpS*, 54,7% o *fib*, 54% o *fnbA*, 53,3% o *icaD*, 47,3% os genes *icaA* e *clfB*, 43,3% o *fnbB*, 17,3% o *bap*, 8% o *cna* e 4% o gene *bbp*.

As diferenças avaliadas entre as cepas, temperaturas e superfícies afetaram significativamente a formação de biofilme, enquanto que os diferentes tempos avaliados não apresentaram efeito significativo.

A maior produção de biofilme foi observada a 25°C, no aço inoxidável. Observou-se que na temperatura de 5°C houve menor formação de biofilmes pelas diferentes cepas de *Staphylococcus* spp.

Todas as cepas apresentaram contagens superiores a 6,0 log, o que indica formação de biofilme, que foi confirmada pela MEV, pela qual observou-se formação de biofilme com as 6 cepas avaliadas.

No presente trabalho foi observada considerável formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. em condições muito utilizadas nas indústrias de laticínios, como as temperaturas empregadas neste estudo e os materiais de superfícies – aço inoxidável e polipropileno. A grande diversidade genotípica encontrada, juntamente com sua capacidade de formação de biofilmes, sugere que a presença de *Staphylococcus* spp pode ser um problema para a indústria, principalmente pelo fato dessas condições serem favoráveis para formação de biofilmes, que podem ser fonte de contaminação de produtos lácteos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.; KHELISSE, O.; IBRAHIM, A.; BENOLIEL, C.; HELIOT, L.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N.E. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 214, p. 38-47, 2015.
- 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.
- ALMEIDA, L.M.; DE ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; DE MENDOÇA, C.L.; MAMIZUKA, E.M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 493-498, 2013.
- ARCIOLA, C.R.; DAVIDE, G.C.S.; CERVELLATI, M.; DONATIA, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, Surrey, v. 23, p. 4233-4239, 2002.
- ARNOLD, S.R.; ELIAS, D.; BUCKINGHAM, S.C.; THOMAS, E.D.; NOVAIS, E.; ARKADER, A.; HOWARD, C. Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 703-708, 2006.
- ATSHAN, S.A.; SHAMSUDIN, M.N.; SEKAWI, Z.; LUNG, L.T.T.; HAMAT, R.A.; KARUNANIDHI, A.; ALI, M.A.; GHAZNAVI-RAD, E.; GHASEMZADEH-MOGHADDAM, H.; SENG, J.S.C.; NATHAN, J.J.; PEI, C.P. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, Barking, v. 2012, p. 514-524, 2012.
- AUSTIN, J.W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995.
- AXELSON, G.K.; GIORGADZE, T.; YOUNGBERG, G.A. Evaluation of the use of Congo red staining in the differential diagnosis of *Candida* vs. various other yeast-form fungal organisms. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 35, p. 27-30, 2008.
- BAIRD-PARKER, A.C. Foodborne salmonellosis. **The Lancet**, London, v. 336, n. 8725, p. 1231-1235, 1990.
- BEENKEN, K.E.; MRAK, L.N.; GRIFFIN, L.M.; ZIELINSKA, A.K.; SHAW, L.N. Epistatic relationships between *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **PloS one**, Berkeley, v. 5, n. 5, p. e10790, 2010.

BERTELLONI, F.; FRATINI F.; EBANI, V.V.; GALIERO, A.; TURCHI, B. ; CERRI, D. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. **Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 95, n. 3, p. 341-352, 2015.

BOHACH, G.A.; FOSTER, T.J. *S. aureus* exotoxins In: FISCHETTI, V.A. **Gram-positive pathogens**. Ann Arbor: American Society for Microbiology, 2000. p. 367-378.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net)**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_informacao_agravos_notificacao_sinan.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2014.

BREMELL, T.; LANGE, S.; YACCOUB, A.; RYDÉN, C.; TARKOWSKI, A. Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 8, p. 2615-2623, 1991.

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.

CAMPOCCIA, D.; SPEZIALEB, P.; RAVAIOLIA, S.; CANGINIA, I.; RINBIB, S.; PIRINA, V.; MONTANAROA, L.; ARCIOLA, C.R. The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. **Biomaterials**, Surrey, v. 30, n. 34, p. 6621-6628, 2009.

CAPPITELLI, F.; POLO, A; VILLA, F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. **Food Engineering Reviews**, Washington, v. 6, n. 1/2, p. 29-42, 2014.

CHARACKLIS, W.G. Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 23, n. 9, p. 1923-1960, 1981.

CHEN, J.; ROSSMAN, M.L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 2, p. 249-254, 2007.

CHEUNG, A.L.; BAYER, A.S.; ZHANG, G.; GRESHAM, H.; XIONG, Y.Q. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 1-9, 2004.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.E.; BISNO, A.; BEACHEY, E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1982.

CRAMTON, S.E.; Gerke, C.; Schnell, N.; Nichols, W.W.; Götz, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and immunity**, Washington, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, 1999.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. BAP, A *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 9, p. 2888-2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; KNECHT, E.; AMORENA, B.; LASA, I.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infection and Immunology**, Washington, v. 70, n. 6, p. 3180-3186, 2002.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.A.; ÚBEDA, C.; TROTONDA M.P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, 2004.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C.Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *staphylococci*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lousville, v. 2, p. 342-353, 2012.

DEIGHTON, M.; CAPSTICK, J.; DOMALEWSKI, E.; VAN, N. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 336, p. 177-195, 2001.

DE SILVA, G.D.I. ; KANTZANOU, M.; JUSTICE, A.; MASSEY, R.C.; WILKINSON, A.R.; DAY, N.P.J.; PEACOCK, S.J. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 382-388, 2002.

DIAZ, C. **Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos**: influencia de la topografía y composición química de la superficie. 2011. 251 p. Dissertação (Doutorando em Química) - Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2011.

DHANAWADE, N.B.; KALOREY, D.R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE S.B.; KURKURE, N.V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 81-89, 2010.

DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT K.; KNOBLOCH J.K.M.; MATTHIAS A. HORSTKOTTE M.A.; MACK D. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 9, p. 2879-2886, 2003.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-90, 2002.

DUGUID, J.P.; ANDERSON, E.S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 92, n. 1, p. 107-137, 1966.

ELHARIRY, H.M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 7, p. 1266-1274, 2011.

EMANEINIA, M.; KHORAMROOZB, S.S.; SHAHSAVANA, S.; DABIRIC, H., JABALAMELIA, F. Prevalence of Pantón-Valentine leucocidin and phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from children with adenoid hypertrophy. **Microbial pathogenesis**, London, v. 89, p. 150-153, 2015.

FABRES-KLEIN M.H.; SANTOS M.J.C.; KLEIN R.C.; DE SOUZA G.N.; RIBON A. DE O. B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC veterinary research**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 3, 2015.

FLINT, S.H.; BREMER, P.J.; BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Chur, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

FRANK, J.F.; CHMIELEWSKI, R. Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. **Journal of Food Protection®**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1178-1182, 2001.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 42, p.872-874, 1989.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA D.R. da; SILVEIRA FILHO, V.M. da; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J. de; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GIBSON, H.; TAYLOR, J.H.; HALL, K.E.; HOLAH, J.T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 41-48, 1999.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; YIN, Y.N.; GYMOESE, P.; VOGEL, B.F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Berkshire, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, 2007.

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**, Washington, v. 69, n. 5, p. 3423-3426, 2001.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HARRAGHY, N.S.; JACOBS, K.; HANNING, M.; MENDER, M.D.; HERRMANN, M. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **The International Journal of Artificial Organs**, Cleveland, v. 29, n. 4, p. 368-378, 2006.

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of staphylococci. In: _____. (ed). **Bacterial adhesion**. Amsterdam: Springer, 2011. p. 105-123.

HOLAH, J.T. Industrial monitoring: hygiene in food processing. In: _____. **Biofilms science and technology**. Amsterdam: Springer, 1992. p. 645-659.

HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1984. v. 1.

JAIN, A., AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, p. 88-92, 2009.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 265-269, 2003.

JOSEFSSON, E.; JUUTI, K.; BOKAREWA, M.; KUUSELA, P. The surface protein Pls of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in septic arthritis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 5, p. 2812-2817, 2005.

KAPLAN, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 89, n. 3, p. 205-218, 2010.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 73, n. 2, p. 310-347, 2009.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R. **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington: ASM Press, 2003. p. 264-282.

KREWER, C.C.; AMANSO, E.S.; GOUVEIA, G.V.; SOUZA, R.L.; COSTA, M.M. da; MOTA, R.A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus*

spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 47, n. 3, p. 511-518, 2015.

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, p. 9-27, 1998.

LANGSRUD, S.; SINDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A. Bacterial disinfectant resistance-a challenge for the food industry. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 283-290, 2003.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 229-233, 2006.

LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research Microbiology**, London, v. 72, n. 2, p. 99-107, 2006.

LE, K.; DASTGHEY, S.; HO, T.; OTTO, M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Lousville, v. 4, 2014.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection®**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005.

LINDSAY, J.A. (Ed.). *Staphylococcus*. In: _____. **Molecular genetics**. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2008. p. 29-131.

LIST of prokariotic names with standing in nomenclature. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 05 Nov. 2015.

MA, Y.; XU, Y.; YESTREPSKY, B.D.; SORENSON, R.J.; CHEN, M.; LARSEN, S.D. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation. **PloS One**, Berkeley, v. 7, n. 10, p. e47255, 2012.

MAFU, A.K.; PLUMETY, C.; DESCHÊNES, L.; GOULET, J. **International Journal of Microbiology**, Stuttgart, v. 2011, n. 15, p. 215-227, 2010.

MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O.S.; ALVES, L.A.F.; ALVES, E.; DE ABREU, L.R.; PICOLLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 538-543, 2007.

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, n. 1, p. 55-64, 2010.

MARTINS, P.D.; ALMEIDA, T.T. de; BASSO, A.P.; MOURA, T.M. de; FRAZZON, J.; TONDO, E.C.; FRAZZON P.G. Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 10, n. 9, p. 771-776, 2013.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; SANDHOLM, T.M.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 6, p. 327-356, 2003.

MCCULLOCH, J.A. **Avaliação da funcionalidade do locus accessory gene regulator (agr) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos**. 2006. 108 p. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELES, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, Berlin, v. 53, n. 7, p. 326-332, 2006.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados dos casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Cidade, 2008.

MERGHNI, A.; NEJMA, M.B.; HELALI, I.; HENTATI, H.; BONGIOVANNI, A.; LAFONT, F.; MAHJOUB AOUNI, M.; MASTOURI, M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 86, p. 1-9, 2015.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2760-2764, 1998.

MONTANARO, L.; SPEZIALE, P.; CAMPOCCIA, D.; PIRINI, V.; RAVAIOLI, S.; CANGINI, I.; VISAI, L.; ARCIOLA, C.R. Polymorphisms of agr locus correspond to distinct genetic patterns of virulence in *Staphylococcus aureus* clinical isolates from orthopedic implant infections. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, Hoboken, v. 94, n. 3, p. 825-832, 2010.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; MCLEAN, R. J. C. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. **World journal of urology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 345-350, 1999.

NEMATI, M.; HERMANS, K.; DEVRISSE, L.A.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in

Staphylococcus aureus isolates from poultry. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 38, n. 6, p. 513-517, 2009.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 133-140, 2006.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, Washington, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OSMAN, K.M.; ABD EL-RAZIK, K.A.; MARIE, H.S.H.; ARAFA, A. Relevance of biofilm formation and virulence of different species of coagulase-negative staphylococci to public health. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 34, n. 10, p. 2009-2016, 2015.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. *Staphylococcal* Infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 64, p. 175-188, 2013.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGABIN, M.J.; HOOK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 48, n. 1, p. 585-617, 1994.

PERCIVAL, S.L.; MALIC, S.; CRUZ, H.; WILLIAMS, D.W. Introduction to biofilms. In: **Biofilms and Veterinary Medicine**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 41-68.

PETTIT, R.K.; WEBER C.A.; KEAN, M.J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G.R.; TAN, R.; FRANKS, K.S.; HORTON, M.L. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.

POMPERMAYER, D.M.C; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 3 - 8, 2009.

QUE, Y.A.; FRANÇOIS, P.; HAEFLIGER, J.A.; ENTENZA, J.M.; VAUDAUX, P.; MOREILLON, P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 10, p. 6296-6302, 2001.

REINOSO, E.B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLERB, C.; BOGNI, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical

mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 3, p. 314-322, 2008.

RIJNAARTSA, H.H.M.; NORDEB, W.; LYKLEMAB J.; ZEHNDERC, A.J.B. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 179-195, 1999.

RODEA T. M, B, LANGSRUDA S., HOLCKA A., MØRETRØ T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 372-383, 2007.

RYDEN, C.; MAXE, I. FRANZÉN, A.; LJUNGH, A.; HEINEGÅRD, D. Selective binding of bone matrix sialoprotein to *Staphylococcus aureus* in osteomyelitis. **The Lancet**, London, v. 330, n. 8557, p. 515, 1987.

RYDEN, C.; TUNG, H.; NIKOLAEV, V.; ENGSTROM, A.; OLDBERG, Å.; BIOCHEM. J. *Staphylococcus aureus* causing osteomyelitis binds to a nonapeptide sequence in bone sialoprotein. **Biochemical Journal**, London, v. 327, p. 825-829, 1997.

SALABERRY S.R.S.; SAIDENBERG A.B.S.; ZUNIGA E.; MELVILLE P.A.; SANTOS F.G.B.; GUIMARÃES E.C; GREGORI F.; BENITES N.R. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine I mastitis. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 257, p. 325-629, 2015.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 2770-2778, 2007.

SEO, Y.; LEE, D.Y.; RAYAMAHJI, N.; KANG, M.L.; YOO, H.S. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, London, 2008, v. 85, no 3, p. 433-438.

SIHORKAR, V.; VYAS, S.P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 18, n. 9, p. 1247-1254, 2001.

SILJAMÄK, P.; VARMANEN, P.; KANKAINEN M.; SUKURA, A.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T.A. Comparative exoprotein profiling of different *Staphylococcus epidermidis* strains reveals potential link between nonclassical protein export and virulence. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 13, n. 7, p. 3249-3261, 2014.

SILVA, E.R.; PEREIRA, A M G.; MORAES, W. S.; SANTORO, K. R.; SILVA, T.R.M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 701-711, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela Editora, 2010. 153 p.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. **Food Control**, Berkshire, v. 13, n. 6, p. 469-477, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 9, p. 407-413, 2009.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.N.; ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, London, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.

SINGH, P. K., SCHAEFER, A. L., PARSEK, M. R., MONINGER, T. O., WELSH, M. J., Y GREENBERG, E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, Paris, v. 407, n. 6805, p. 762-764, 2000.

SMELTZER, M.; GILLASPY, A.; PRATT JR, F.L.; THAMES, M.D.; LANDOLO, J.J. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. **Gene**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 249-259, 1997.

SPEZIALE, P.; PIETROCOLA, G.; FOSTER, T.; GEOGHEGAN, J.A. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. **Frontiers in Cellular and infection microbiology**, Lousville, v. 4, 2014.

SPIERS, A.J.; RAINEY, P.B. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. **Microbiology**, Paris, v. 151, n. 9, p. 2829-2839, 2005.

SREY, S.; JAHID, I.K; SANG-DO, H.A. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, Berkshire, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

STEPANOVIĆ, S.; DRAGANA V.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, Copenhagen, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C.J; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena.

Journal Industry Microbiology and Biotechnology, London, v. 29, n. 6, p. 361-367, 2002.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 40, n. 2, p. 79-89, 1994.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI S.; FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. **Poland Journal Microbiology**, Civitas Schinesghe, v. 61, n. 1, p. 65-69, 2012.

TANEIKE, I.; OTSUKA, T.; DOHMAE, S.; SAITO, K.; OZAKI, K.; TAKANO, M.; TAKANO, W.; TAKANO, T.; YAMAMOTO, T. Molecular nature of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* derived from explosive nosocomial outbreaks of the 1980s in Japan. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 580, n. 9, p. 2323-2334, 2006.

TANG, J.; KANG, M.; CHEN, H.; SHI, X.; ZHOU, R.; CHEN, J.; DU, Y. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. **Science China Life Sciences**, Pekin, v. 54, n. 9, p. 863-869, 2011.

TAPALAD, T.; NERAMITTAGAPONG, A.; NERAMITTAGAPONG S.; BOONMEE, M. Degradation of Congo Red dye by ozonation. **Chiang Mai Journal Science**, Pekin, v. 35, p. 63-68, 2008.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? **Microbiology**, Civitas Schinesghe, v. 151, p. 2465-2475, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4465-4467, 2003.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 241-247, 2004.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VANNI, M.; TONETTI, R.; PRETTI, C.; CREMA, F.; SOLDANI, G.; MEDUCCI, V.; INTORRE, L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, p. 192-195, 2009.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; 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. 179-185, 2003.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Current Microbiology**, New York, v. 66, n. 2, p. 110-121, 2013.

VIANA, D.; SELVA, L.; GARCÍA-QUIRÓS, A.; PENADÉS, M.; PENADÉS, J.R.; CORPA, J.M. Screening of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 1., 2012, Valencia: **Journal of the World Rabbit Science Association**, 2012. p. 1175-1179.

WANN, E.R.; GURUSIDDAPPA, S.; HÖÖK, M. The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 18, p. 13863-13871, 2000.

WANNER, O.; GUJER, W. A multispecies biofilm model. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 28, n. 3, p. 314-328, 1986.

WINKELSTRÖTER, I.K.; TEIXEIRA, F.B.R.; SILVA, E.P.; ALVES, V.F.A.; MARTINIS, E.C.P. de. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**, New York, v. 68, n. 1, p. 35-46, 2014.

WIŚNIEWSKA, K.; PIÓRKOWSKA, A.; KASPRZYK, J.; BRONK, M.; ŚWIEĆ, K. Clonal distribution of bone sialoprotein-binding protein gene among *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infections. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 59, n. 6, p. 465-471, 2014.

WONG, L.A.C. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. Geneve, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

YACoub, A.; LINDAHL, P.; RUBIN, K.; WENDEL, M.; HEINEGARD, D.; RYDÉN, C. Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 222, n. 3, p. 919-925, 1994.

ZHANG, X.; WU, M.; ZHUO, W.; GU, J.; ZHANG, S.; GE, J.; YANG, M. Crystal structures of Bbp from *Staphylococcus aureus* reveal the ligand binding mechanism with Fibrinogen α . **Protein & cell**, Beijing, v. 6, n. 10, p. 757-766, 2015.

ZMANTAR, T.; CHAIEB, K.; MAKNI, H.; MILADI, H.; ABDALLAH, F.B.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection by PCR of adhesins genes and slime

production in clinical *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 308-314, 2008.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 39-56, 1943.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern? **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.

ZUNIGA, E.; MELVILLE, P.A.; SAIDENBERG, A.B.S.; LAES, M.A.; GONSALES, F.F.; SALABERRY, S.R.S.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P.E.; DOS SANTOS, F.G.B.; LINCOPAN, N.E.; BENITES, N.R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 89, p. 1-6, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A - Géis de agarose

Nas Figuras 26 até 32 se apresentam os géis de agarose da pesquisa dos 12 genes nos isolados de laticínio e de leite de vacas com mastite subclínica.

Figura 26 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *icaA* (1315 pb). 1- marcador molecular de 100 pb; 2 – *S. aureus* N315; 3 – Controle Negativo (reação de PCR sem DNA); 4– cepa 92; 5- cepa 93; 6- cepa 94; 7- cepa 95; 8- cepa 96 ; 9- cepa 97; 10 – cepa 98; 11 – cepa 99; 12 – cepa 100; 13 – cepa 101; 14 – cepa 102; 15 - cepa 103

Figura 27 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *icaD* (381). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – *S. aureus* N315; 3 – Controle Negativo (reação de PCR sem DNA); 4– cepa 51; 5- cepa 53; 6- cepa 56; 7- cepa 63; 8- cepa 66 ; 9- cepa 67; 10 – cepa 69; 11 – cepa 71; 12 – cepa 72; 13 – cepa 74; 14 – cepa 75; 15 - cepa 78

Figura 28 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificacao por PCR de fragmentos do gene *bap* (971 pb). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – cepa 5008; 3 – Controle Negativo (reacao de PCR sem DNA); 4– cepa 1F; 5- cepa 17F; 6- cepa 18F; 7- cepa 2F; 8- cepa 4F ; 9- cepa 74F; 10 – cepa 82F; 11 – cepa 41; 12 – cepa 43; 13 – cepa 44; 14 – cepa 72; 15 - cepa 100

Figura 29 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificacao por PCR de fragmentos dos genes *ebpS* (652 pb) e *fnbA* (127 pb). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – cepa *FRI* 361; 3 – Controle Negativo (reacao de PCR sem DNA); 4– cepa 1F; 5- cepa 2F; 6- cepa 4F; 7- cepa 6F; 8- cepa 7F ; 9- cepa 17F; 10 – cepa 18F; 11 – cepa 19F; 12 – cepa 22F; 13 – cepa 23F; 14 – cepa 24F; 15 - cepa 26F

Figura 30 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificacao por PCR de fragmentos do gene *eno* (302 pb), *bbp* (575 pb) e *cna* (423 pb). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – cepa *FRI 361* e *WB49*; 3 – Controle Negativo (reacao de PCR sem DNA); 4– cepa 89F; 5- cepa 91F; 6- cepa 92F; 7- cepa 114F; 8- cepa 101F ; 9- cepa 78; 10 – cepa 79; 11 – cepa 80; 12 – cepa 90; 13 – cepa 74; 14 – cepa 75; 15 - cepa 88

Figura 31 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificacao por PCR de fragmentos do gene *fnbB* (524 pb) e *clfA* (292 pb). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – cepa *USA 300* e *WB49*; 3 – Controle Negativo (reacao de PCR sem DNA); 4– cepa 22F; 5- cepa 23F; 6- cepa 24F; 7- cepa 25F; 8- cepa 26F ; 9- cepa 28F; 10 – cepa 31F; 11 – cepa 32F; 12 – cepa 33F; 13 – cepa 36F; 14 – cepa 37F; 15 - cepa 45F

Figura 32- Gel de agarose representativo de produtos de amplificacao por PCR de fragmentos do gene *fib* (404 pb) e *clfB* (205 pb). 1- marcador molecular 100 pb; 2 – cepa USA 300 e WB49 ; 3 – Controle Negativo (reacao de PCR sem DNA); 4– cepa 1F; 5- cepa 2F; 6- cepa 126F; 7- cepa 18F; 8- cepa 133F ; 9- cepa 44; 10 – cepa 84; 11 – cepa 63; 12 – cepa 75; 13 – cepa 124; 14 – cepa 140; 15 - cepa 120A

Apêndice B - Perfis genotípicos dos isolados

Tabela 21 - Perfil genotípico dos isolados de leite de vacas com mastite subclínica

Nº de isolados	Código da cepa	Espécie	Perfil genotípico
11	1F,2F,4F,6F,7F,46F, 47F^A ,50F,54F,55F,91F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
5	17F, 31F,32F,33F,133F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB</i>
5	18F*, 66FB**, 74F, 88F, 114F	<i>S. hycus*</i> , <i>S. xilosus**</i> , <i>S. aureus</i>	<i>eno fnbB clfA</i>
3	36F,37F,132F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB</i>
3	51F,59F, 66FA**	<i>S. aureus</i> , <i>S. xilosus**</i>	<i>Eno clfA</i>
3	19F*, 60F*,92F	<i>S. hycus*</i> , <i>S. aureus</i>	<i>clfA</i>
2	45F, 82F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
1	26F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib fnbB</i>
1	85F^A	<i>S. aureus</i>	<i>icaA bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
1	18F	<i>S. aureus</i>	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno clfA</i>
1	24F	<i>S. aureus</i>	<i>icaD bap ebpS fnbA eno fib fnbB clfA</i>
1	79F^A	<i>S. aureus</i>	<i>icaD bap ebpS fnbA eno fib clfA</i>
1	126F	<i>S. aureus</i>	<i>icaD bap eno fib clfB clfA</i>
1	63F	<i>S. aureus</i>	<i>bap ebpS eno fib clfA</i>
1	101F	<i>S. aureus</i>	<i>ebpS eno fib fnbB clfA</i>
1	123F	<i>S. aureus</i>	<i>icaD bap ebpS fib clfA</i>
1	141F^A	<i>S. aureus</i>	<i>bap ebpS eno clfA</i>
1	139F	<i>S. aureus</i>	<i>ebpS fnbA eno clfA</i>
1	89F	<i>S. aureus</i>	<i>fnbA eno fib clfA</i>
1	90F	<i>S. aureus</i>	<i>ebpS eno clfA</i>
1	87F	<i>S. aureus</i>	<i>ebpS clf A</i>
1	57F	<i>S. hycus</i>	<i>ebps eno</i>
1	22F	<i>S. aureus</i>	<i>fnbB clfA</i>
---	150F	<i>S. chromogenes</i>	---

^A cepas selecionadas para quantificação de biofilmes

Tabela 22- Perfil genotípico dos isolados no laticínio

(continua)

Nº de isolados	Código da cepa	Espécie	Origem	Perfil genotípico
14	85,130,132,134,139* , 141,143,145,185,19 3.202 ^A , 203,205,20	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> *	QD*, manipulador, leite cru, Piso	<i>eno clfA</i>
13	41, 43,51,74, 75, 78, 81, 82, 99, 101, 102, 326, 120A	<i>S. aureus</i>	Leite cru, Manipulador, QD, leite pasteurizada	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
9	63, 66, 67, 71, 95, 103, 318, 319, 320	<i>S. aureus</i>	Manipulador, QA, leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
9	129,131,133,136,14 0,183,184,201 ^A ,20	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> *	Manipulador, tanque, leite cru, QA	<i>eno fnbB clfA</i>
7	213, 214, 215, 216, 217, 219, 322	<i>S. aureus</i>	QD, leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno clfB clfA</i>
6	86, 87, 93, 94, 96,	<i>S. aureus</i>	QD, leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA cna eno fib clfB clfA</i>
5	137,138, 142, 144, 199	<i>S. aureus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>s.</i> <i>epidermidis</i>	Manipuladores	<i>eno</i>
4	79 ^A , 80, 83, 98	<i>S. aureus</i>	QD, leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA cna eno fib clfB fnbB</i>
3	45,122*,337	<i>S. aureus</i> , <i>S. hycus</i> *	Salmoura, leite cru*, QD	<i>ebpS eno fib fnbB clfA</i>
2	69, 100	<i>S. aureus</i>	QA, Leite cru	<i>icaA icaD bap ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
2	46, 128	<i>S. aureus</i>	Embaladeira, leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp eno fib clfB fnbB</i>
2	45, 82	<i>S. aureus</i>	Salmoura /QD	<i>icaA icaD ebpS fnbA eno fib clfB clfA</i>
2	333, 335	<i>S. aureus</i>	Mesa de trabalho	<i>ebpS eno fib clfB fnbB clfA</i>
2	84,174	<i>S. aureus</i>	QD	<i>ebpS eno clfA</i>
2	44	<i>S. aureus</i>	Salmoura	<i>fnbB clfA</i>
1	49	<i>S. aureus</i>	QA	<i>icaD fnbA fib fnbB clfA</i>
1	47 ^A	<i>S. aureus</i>	QA	<i>bbp fib fnbB clfA</i>
1	208	<i>S. aureus</i>	QA	<i>eno fib fnbB clfA</i>

Tabela 22- Perfil genotípico dos isolados no laticínio

(conclusão)

Nº de	Código da cepa	Espécie	Origem	Perfil genotípico
1	72	<i>S. aureus</i>	QD	<i>icaD bap ebpS fib clfA</i>
1	221	<i>S. aureus</i>	QD	<i>icaD clfA</i>
1	212	<i>S.aureus</i>	QD	<i>clfA</i>
1	88	<i>Hycus</i>	QD	<i>ebpS</i>
1	123	<i>S. aureus</i>	Leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp eno fib fnbB clfA</i>
1	119^A	<i>S. aureus</i>	Leite cru	<i>icaA icaD ebpS fnbA bbp cna eno fib clfB fnbB clfA</i>
1	127	<i>S.aureus</i>	Leite cru	<i>ebpS cna eno fnbB clfA</i>
1	120B	<i>Hycus</i>	Leite Cru	<i>ebpS fnbB clfA</i>
1	124	<i>S. hycus</i>	Leite cru	<i>ebpS bbp fnbB clfA</i>
1	53	<i>S. aureus</i>	Leite cru	<i>icaA icaD fnbA eno fib clfB clfA</i>
1	125	<i>S. aureus</i>	Leite Cru	<i>icaD fnbA eno fib fnbB clfA</i>
1	192	<i>S. aureus</i>	Mesa	<i>fnbA eno fnbB clfA</i>
1	331	<i>S. aureus</i>	Tanque	<i>fnbA eno fnbB clfA</i>
1	56	<i>S. aureus</i>	Tanque	<i>icaD fnbA eno clfA</i>
1	330^A	<i>S. aureus</i>	Tanque	<i>icaD ebpS fnbA eno fib clfB fnbB clfA</i>
1	92	<i>S. aureus</i>	Forma de queijo	<i>icaA icaD ebpS fnbA fib fnbB clfA</i>
1	135	<i>S. warneri</i>	Manipulador	<i>ebpS eno fnbB clfA</i>
---	90, 200*	<i>S. aureus, S. epidermidis*</i>	Manipulador	---

QA = Queijo antes da embalagem, QD = Queijo depois da embalagem, ^A cepas selecionadas para quantificação de biofilmes