

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS REALEZA**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DENIS AURELIO LOPES DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA NISINA SOBRE CEPAS DE**  
***Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA**

**REALEZA**

**2024**

**DENIS AURELIO LOPES DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA NISINA SOBRE CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dalila Moter Benvegnú

**REALEZA**

**2024**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Oliveira, Denis Aurelio Lopes de  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA NISINA SOBRE  
CEPAS DE Staphylococcus aureus ISOLADAS DE MASTITE  
BOVINA / Denis Aurelio Lopes de Oliveira. -- 2024.  
36 f.:il.

Orientadora: Doutora Dalila Moter Benvegnú

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. bacteriocina. 2. Lactococcus lactis. 3.  
bovinocultura leiteira. 4. vacas leiteiras. 5.  
antimicrobiano. I. Benvegnú, Dalila Moter, orient. II.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**DENIS AURELIO LOPES DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA NISINA SOBRE CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 22/11/2024.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente.  
**gov.br** DALILA MOTER BENVEGNÚ  
Data: 09/12/2024 16:15:00-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dalila Moter Benvegnú – UFFS**  
Orientadora

Documento assinado digitalmente.  
**gov.br** KARINA RAMIREZ STARIKOFF  
Data: 09/12/2024 07:34:34-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Ramirez Starikoff – UFFS**  
Avaliador

Documento assinado digitalmente.  
**gov.br** EDINEIA PAULA SARTORI SCHMITZ  
Data: 08/12/2024 19:41:05-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Téc. Dr.<sup>a</sup> Edinéia de Paula Sartori Schmitz – UFFS**  
Avaliador

*Dedico este trabalho à minha família, cuja presença, apoio incondicional e amor foram a base de cada conquista ao longo da minha trajetória, amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e ao universo por me concederem forças para lutar e por me guiarem pelo caminho da verdade e da justiça, colocando poucas, mas boas pessoas em minha vida durante essa trajetória científica.

Agradeço à minha mãe, **Antonia**, que nunca mediu esforços para me apoiar e cuidar de mim. Sem a senhora, eu não seria nada nesta vida. Te amo, minha mãezinha. Ao meu pai, **Antonio**, minha gratidão por ter me ensinado desde pequeno o valor da justiça, o certo e o errado, e que o trabalho dignifica o homem. Foram esses ensinamentos que me deram coragem para largar tudo e seguir um sonho a 3.600 km de distância. Obrigado por tudo, pai e mãe.

Agradeço à minha família e aos meus irmãos, **Danilo** e **Luciana**, que, mesmo à distância, nunca pouparam esforços para me apoiar e confortar em todos os momentos de dificuldade. Com gestos e palavras de carinho, sei que estiveram ao meu lado e torceram por mim durante toda essa jornada.

Agradeço profundamente a **Marilda** e **José**, que, com imensa generosidade e carinho, cuidaram de mim e me ajudaram em tudo que estava ao alcance, não apenas como avós do meu filho, mas como pessoas de coração bondoso e altruísta. Apesar de minhas limitações com as palavras, deixo aqui meu mais sincero e profundo agradecimento: muito obrigado.

Agradeço imensamente à minha companheira e amada, **Larissa**, pelo amor, paciência e apoio incondicional em cada etapa desta jornada. Sua presença ao meu lado foi fundamental, seja nos momentos de dúvida, onde suas palavras de encorajamento me fortaleceram, seja nas horas de alegria, quando comemoramos cada pequena vitória juntos. Obrigado por sempre acreditar em mim, por sua dedicação e por me inspirar a ser uma pessoa e um profissional melhor. Este trabalho é também reflexo de tudo o que construímos juntos.

Agradeço ao meu filho, **Zyan Castiel**, cuja presença ilumina meus dias e renova minha força a cada momento. Sua alegria e amor puro são minha maior inspiração, impulsionando-me a buscar sempre o melhor em tudo o que faço. Este trabalho é também para você, meu filho, com toda a gratidão e amor de um pai orgulhoso. Saiba que sem você, talvez eu já tivesse desistido; agradeço todos os dias por ter você em minha vida. Te amo.

Não citarei nomes para ninguém ficar de fora mas vocês sabem quem são e agradeço aos meus poucos, mas bons amigos, que passaram pela minha vida durante a trajetória universitária. A presença de vocês tornou essa jornada mais leve e significativa, proporcionando apoio, risadas e momentos de aprendizado que levarei para sempre comigo.

Sou grato por cada instante compartilhado e por cada palavra de incentivo. Obrigado por estarem ao meu lado, contribuindo para que essa conquista fosse possível.

Agradeço à Universidade Federal da Fronteira Sul, uma instituição pública e de qualidade, e a todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica. Sou profundamente grato pela dedicação e pelo conhecimento compartilhado ao longo desses anos, fundamentais para a construção do meu aprendizado e crescimento pessoal. Ter estudado em uma universidade pública de excelência é um privilégio que levarei comigo, e cada aula, orientação e desafio enfrentado contribuíram para que eu me tornasse o profissional que sou hoje.

Agradeço em particular aos professores que, em diferentes momentos da graduação, acreditaram em mim e me deram a oportunidade de ser seu orientando, seja em projetos de extensão, monitoria, estágio ou iniciação científica. Marcelo Zanetti, Letiére Cabreira Soares, Maiara Blagitz, Vanessa Silva Retuci, Iucif Abrão Nascif Júnior e em especial minha orientadora do TCC Dalila Moter Benvegnú. Vocês foram fundamentais para aguçar meu senso crítico, ampliar minha visão de mundo e fortalecer minha capacidade analítica. Graças aos seus incentivos e orientações, pude enfrentar desafios acadêmicos com mais confiança e desenvolver habilidades que levarei para toda a vida. A cada discussão, orientação e apoio, vocês não só contribuíram para a minha formação profissional, mas também para o meu crescimento pessoal. Minha gratidão será eterna.

Por fim, agradeço a mim mesmo, pela coragem de persistir, pela dedicação em cada desafio e pela determinação de seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis e apesar das críticas e de quem não acreditou na minha jornada. Reconheço o esforço, as noites em claro e a força para não desistir, que me trouxeram até aqui. Esse caminho foi repleto de obstáculos, mas também de superações, e tenho orgulho da pessoa e do profissional que me tornei ao longo dessa trajetória.

## RESUMO

A mastite, uma inflamação da glândula mamária, é a doença mais comum em rebanhos leiteiros, sendo frequentemente causada pela bactéria *Staphylococcus aureus*, um patógeno com elevada capacidade de formação de biofilmes, que dificulta o tratamento devido à sua resistência a antimicrobianos convencionais. A crescente resistência antimicrobiana demanda novas abordagens, sendo a nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, um peptídeo promissor por sua atividade contra bactérias gram-positivas, incluindo o *S. aureus*. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana da nisina in vitro contra cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, especificamente na inibição da formação de biofilme e na erradicação de biofilmes já estabelecidos. Para a investigação, foi utilizada uma solução padrão de 1000 UI de nisina dissolvida em solução de HCl, aplicada sobre amostras de *S. aureus* distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços. O método experimental foi dividido em duas etapas principais: primeiro, foi verificada a capacidade da nisina em inibir a formação de biofilme por cepas previamente padronizadas, seguido pela avaliação da capacidade da nisina em erradicar biofilmes estabelecidos após 24 horas de incubação. Para mensurar a formação e redução do biofilme, foram realizados procedimentos de lavagem, fixação com metanol e coloração com cristal violeta, com subsequente leitura da densidade óptica (DO) em leitora de microplaca a 600 nm. Os resultados mostraram que a nisina reduziu significativamente a adesão inicial das bactérias, indicando sua eficácia na prevenção da formação de biofilmes ( $z = 2,366$ ,  $p < 0,0001$ ,  $r = 0.63$ ). Contudo, quando aplicada em biofilmes formados após 24 horas, demonstrou baixa capacidade de remoção, revelando a limitada eficácia desse peptídeo antimicrobiano na desestruturação de biofilmes estabelecidos ( $z = -0,330$ ,  $p = 0,0395$ ,  $r = 0.1$ ). Esses achados reforçam a necessidade de novas estratégias, incluindo o uso combinado de nisina com outros agentes antimicrobianos ou tecnologias de liberação controlada, para aumentar sua ação contra biofilmes maduros. Este estudo contribui para o campo ao identificar as limitações da nisina como agente único e destaca a importância de explorar alternativas que potencializem seu uso no combate à mastite bovina associada a cepas de *S. aureus* resistentes. Essa pesquisa abre caminho para futuras investigações sobre tratamentos antibiofilmes e outras abordagens inovadoras, relevantes para o contexto crescente de resistência antimicrobiana em patógenos de interesse veterinário.

Palavras-chave: bacteriocina; *Lactococcus lactis*; bovinocultura leiteira; vacas leiteiras; antimicrobiano.

## ABSTRACT

Mastitis, an inflammation of the mammary gland, is the most common disease in dairy cattle, frequently caused by *Staphylococcus aureus*, a pathogen with a high capacity for biofilm formation, which complicates treatment due to its resistance to conventional antimicrobials. Increasing antimicrobial resistance demands new approaches, with nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*, emerging as a promising peptide for its activity against Gram-positive bacteria, including *S. aureus*. This study aimed to evaluate the in vitro antimicrobial efficacy of nisin against *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis cases, specifically in inhibiting biofilm formation and eradicating established biofilms. A standard nisin solution was prepared at 1000 UI, dissolved in HCl and applied to *S. aureus* samples distributed in 96-well microtiter plates. The experimental method was divided into two main stages: first, the capacity of nisin to inhibit biofilm formation was tested on pre-standardized strains, followed by an assessment of the capacity of nisin to eradicate biofilms established after 24 hours of incubation. To measure biofilm formation and reduction, procedures included washing, methanol fixation, and crystal violet staining, with subsequent optical density (OD) readings taken in a microplate reader at 600 nm. The results showed that nisin significantly reduced the initial bacterial adhesion, indicating its effectiveness in preventing biofilm formation ( $z = 2.366$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r = 0.63$ ). However, when applied to biofilms formed after 24 hours, it demonstrated low removal capacity, revealing the limited efficacy of this antimicrobial peptide in disrupting established biofilms ( $z = -0.330$ ,  $p = 0.0395$ ,  $r = 0.1$ ). These findings underscore the need for new strategies, including the combined use of nisin with other antimicrobials or controlled-release technologies, to enhance its action against mature biofilms. This study contributes to the field by identifying the limitations of nisin as a standalone agent and highlights the importance of exploring alternatives that could enhance its use against bovine mastitis associated with resistant *S. aureus* strains. This research contribute for further investigations around antibiofilm treatments and other innovative approaches, relevant in the context of increasing antimicrobial resistance in veterinary pathogens.

Keywords: bacteriocin; *Lactococcus lactis*; dairy cattle; dairy cows; antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Efeito da nisina contra formação de biofilme em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	22
Figura 2 — Efeito inibitório de 1000 UI de nisina sobre a formação de biofilme em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> fortemente formadoras (n=7 cepas). Os dados estão apresentados na forma de mediana $\pm$ intervalo interquartil. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle.....	23
Figura 3 — Efeito de 1000 UI de nisina sobre a erradicação de biofilme pré-formado em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> fortemente formadoras.....	24
Figura 4 — Efeito de 1000 UI de nisina sobre a erradicação de biofilme em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> fortemente formadoras (n=7 cepas). Os dados estão apresentados na forma de mediana $\pm$ intervalo interquartil. * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Resultados do teste CMT e relação com CCS encontrada no leite.....	13
Tabela 2 — Classificação das cepas de acordo com a quantidade de biofilme produzido.....	18
Tabela 3 — Grau estimado de formação de biofilme das cepas de S. aureus verificado pela leitura da densidade óptica em microplacas.....	21

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1	SOLUÇÃO PADRÃO DE NISINA.....	17
3.2	CEPAS UTILIZADAS.....	17
<b>3.2.1</b>	<b>Padronização da suspensão.....</b>	<b>17</b>
3.3	GRAU ESTIMADO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	18
<b>3.3.1</b>	<b>Categorização das cepas quanto a produção de biofilme.....</b>	<b>18</b>
3.4	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	19
3.5	CAPACIDADE DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILME JÁ FORMADO.....	19
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
4.1	GRAU ESTIMADO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	21
4.2	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	22
4.3	ERRADICAÇÃO DO BIOFILME JÁ FORMADO.....	24
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mastite é a enfermidade mais prevalente nos rebanhos leiteiros em todo o mundo, sendo caracterizada pela inflamação da glândula mamária. Suas causas podem ser microbiológicas, incluindo bactérias, vírus, fungos e leveduras, ou não microbiológicas, como traumas e reações de hipersensibilidade (Ruegg, 2017). A doença é classificada em mastite clínica e subclínica, de acordo com a presença de alterações no leite e na glândula mamária, além de sinais sistêmicos. A mastite clínica, por sua vez, é dividida em três graus: leve, moderada e severa, dependendo da gravidade dos sinais. A forma leve apresenta apenas alterações no aspecto do leite, como flocos e coagulação; a moderada envolve sinais de inflamação no úbere; e a severa inclui sintomas sistêmicos no animal, como febre e apatia (Wolowski *et al.*, 2020; Ruegg, 2023).

A mastite microbiológica pode ser causada por patógenos contagiosos ou ambientais. A mastite contagiosa é transmitida entre vacas, especialmente durante a ordenha, e os principais patógenos associados incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma* spp. (Oikonomou *et al.*, 2014). O *S. aureus* é especialmente problemático devido à sua capacidade de formar abscessos e persistir nos tecidos mamários, resultando em infecções crônicas, difíceis de tratar (Calvinho; Dallard, 2023). Já *Streptococcus agalactiae* é conhecido por causar infecções que se propagam rapidamente entre os animais, mas geralmente respondem bem ao tratamento com antibióticos (Meroni *et al.*, 2022). A mastite ambiental, por outro lado, é causada por patógenos presentes no ambiente, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Streptococcus uberis*. Essas infecções, geralmente mais agudas e severas, são mais comuns em ambientes com má higiene ou onde há acúmulo de matéria orgânica (Dobrut *et al.*, 2023).

Um dos fatores críticos que agravam a mastite causada por *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilme, o que dificulta tanto a eliminação do patógeno pelo sistema imunológico do animal quanto o sucesso dos tratamentos com antimicrobianos (Foroutan *et al.*, 2022). O biofilme é uma estrutura multicelular composta por bactérias envolvidas em uma matriz de exopolissacarídeos, que protege as células bacterianas dos agentes antimicrobianos e do sistema de defesa do hospedeiro (Casanova *et al.*, 2016). Essa habilidade de formar biofilme está associada a genes como *icaA* e *icaD*, presentes em muitas cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite. Dessa forma, a formação de biofilme torna a erradicação do patógeno mais difícil, exigindo abordagens terapêuticas mais agressivas ou inovadoras (Mello *et al.*, 2020; Ibrahim *et al.*, 2022).

Entre as alternativas para o tratamento de infecções por *S. aureus*, destaca-se a nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*. A nisina é um peptídeo antimicrobiano que apresenta atividade contra uma ampla variedade de bactérias gram-positivas, incluindo *S. aureus*. Descoberta em 1928, ela tem sido amplamente utilizada como conservante alimentar em mais de 50 países (Reiners *et al.*, 2020). Embora seu uso seja predominante na indústria de alimentos, o potencial terapêutico da nisina na medicina veterinária tem sido amplamente estudado devido à sua capacidade de inibir a formação de biofilmes e de destruir células bacterianas em infecções subclínicas e clínicas (Field *et al.*, 2016).

Estudos recentes sugerem que a nisina, além de ser eficaz contra *S. aureus*, apresenta baixa toxicidade para o hospedeiro e um baixo risco de desenvolvimento de resistência bacteriana. Isso a torna uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais, especialmente em um contexto de crescente resistência antimicrobiana (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016). O uso da nisina e de outros agentes antibiofilme surgem como uma abordagem inovadora no manejo da mastite bovina, oferecendo uma solução eficaz para combater patógenos resistentes que formam biofilmes, como o *S. aureus*.

Diante das características promissoras atualmente estudadas da molécula de nisina no tratamento de processos infecciosos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* de nisina sobre cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, por meio da determinação da inibição da formação de biofilme e capacidade de erradicação de biofilme já formado em cepas forte formadoras de biofilme.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença da mastite pode ser classificada em mastite clínica e subclínica, variando de acordo com as alterações na composição e aspecto do leite e glândula mamária, além de sinais clínicos sistêmicos no animal acometido. A mastite clínica é dividida ainda em três categorias distintas de acordo com a gravidade dos sinais apresentados, sendo categorizada como leve, moderada e severa (Rollin; Dhuyvetter; Overtona, 2015).

- Mastite clínica leve: Encontra-se apenas alterações no aspecto do leite (coágulos, flocos, viscosidade e cor);
- Mastite clínica moderada: Apresenta alterações no leite e na glândula mamária (sinais de inflamação no tecido mamário do animal como dor, edema e rubor);
- Mastite clínica grave: Alterações no leite, na glândula mamária e o animal apresenta sinais de alterações sistêmicas (alterações na frequência ruminal, temperatura, apetite e comportamento).

A identificação das alterações no leite em um animal com mastite clínica, deve ser realizada através do teste da caneca de fundo escuro, onde o funcionário realiza a ordenha dos três primeiros jatos de cada teto sobre uma caneca telada de cor preta e observa com o intuito de identificar a presença de coágulos, flocos ou grumos que indicam algum tipo de alteração no leite (Menezes; Milhomem; Silva, 2023).

Os sinais na glândula mamária são principalmente os sinais da inflamação, como aumento de sensibilidade e dor ao manipular o local, aumento da temperatura do tecido mamário, vermelhidão e edema na região que pode ser avaliado com o sinal de *godet* positivo, que consiste no ato de pressionar com firmeza o dedo sobre o local onde há suspeita de haver edema. Após alguns segundos, o dedo é retirado e observa-se a permanência da depressão no local pressionado, indicando uma positividade no teste (Adkins; Middleton, 2018; Patel; Skok; DeMarco, 2022).

Em casos mais graves o animal pode apresentar sinais sistêmicos variados como diminuição da ingestão de alimento, redução da produção de leite, apatia, febre, alterações no comportamento do animal, e a depender do patógeno envolvido com o quadro, como por exemplo, no acometimento por *E. coli*, pode haver danos irreversíveis ao tecido mamário capaz de provocar a perda completa da produção de leite e até levar o animal a óbito (Cheng; Gu Han, 2020).

Diferente da mastite clínica, a mastite subclínica não apresenta sinais visíveis no leite ou no animal que possam indicar o acometimento por alguma enfermidade além da

diminuição da produção de leite, por isso, torna-se um desafio aos produtores que não têm o conhecimento adequado sobre o tema, que ao se depararem com um caso subclínico de mastite, conseguem reconhecer apenas através de alterações na produção da vaca. Além disso, em fazendas com mais animais, e que não tenham um controle adequado da produção pode vir a tornar-se um problema (Adkins; Middleton, 2018).

Diversos parâmetros no leite são alterados durante o processo de mastite subclínica, sendo o principal e mais facilmente identificável o aumento da contagem de células somáticas (CCS), que são principalmente macrófagos, neutrófilos, células epiteliais de descamação e outras células mononucleares presentes na glândula mamária do animal (Alhussien; Panda; Dang, 2021; Mosca *et al.*, 2023).

O aumento da CSS pode estar relacionado a um processo infeccioso na glândula mamária, entretanto, animais velhos, fêmeas no final da lactação ou que tenham sofrido algum tipo de lesão no tecido mamário podem apresentar aumento da CCS, sendo considerado mastite subclínica os animais que apresentam valores de CCS > 200.000 células mL<sup>-1</sup> de leite (Brasil, 2019).

O valor da CCS pode ser avaliado por diversos testes, sendo o mais utilizado devido sua praticidade e baixo custo o *California mastitis test* (CMT), que corresponde a uma medição qualitativa da amostra onde o reagente causa a destruição das membranas celulares presentes na amostra e provoca a precipitação do DNA e proteínas dessas células, resultando em uma alteração da viscosidade. A interpretação do teste é subjetiva, podendo variar de pessoa para pessoa, sendo indicado que seja realizado a cada 15 dias em todas as vacas do rebanho, no momento antes da ordenha, e os resultados são interpretados de acordo com a Tabela 1 (Kaouche-Adjlane; Mansour, 2020; Abdulkhader *et al.*, 2022).

Tabela 1 — Resultados do teste CMT e relação com CCS encontrada no leite.

Resultado CMT	Viscosidade	CCS (x1000 células/mL)
0	Ausente	0 – 200
Traços	Leve	200 – 500
+	Leve/Moderada	500 – 1.500
++	Moderada/Intensa	1000 – 5.000
+++	Intensa	> 5.000

Fonte: Adaptado de Brasil, 2015.

A mastite infecciosa em bovinos pode ser classificada em duas categorias principais com base nos patógenos que a causam: mastite contagiosa e mastite ambiental. Na mastite

contagiosa, os patógenos são transmitidos diretamente de uma vaca para outra, geralmente durante a ordenha. Os principais agentes patogênicos associados a essa forma de mastite incluem *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma spp* (Oikonomou *et al.*, 2014). O *S. aureus* é particularmente problemático devido à sua capacidade de formar abscessos e de persistir nos tecidos mamários, resultando em infecções crônicas e de difícil tratamento (Metzger *et al.*, 2018). O *Streptococcus agalactiae* é responsável por infecções que se espalham rapidamente entre os animais, mas que geralmente respondem bem ao tratamento com antibióticos (Meroni *et al.*, 2022).

A mastite ambiental, por outro lado, é causada por patógenos presentes no ambiente da vaca, como a cama, água e outros materiais em contato com o úbere. Os principais patógenos nesse caso incluem bactérias coliformes, como *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*, e *Streptococcus uberis* (Dobrut *et al.*, 2023). Essas infecções tendem a ser mais agudas e severas, especialmente as causadas por *E. coli*, que podem provocar quadros de mastite clínica grave com risco de sepse. A prevalência da mastite ambiental é maior em sistemas de criação onde as condições de higiene são inadequadas ou onde há maior umidade e acúmulo de matéria orgânica. A prevenção de ambos os tipos de mastite envolve práticas rigorosas de manejo, controle da higiene durante a ordenha e melhoria das condições de alojamento (Breen, 2021; Goulart; Mellata, 2022).

Veiga *et al.*, (2021) avaliaram estudos publicados entre os anos de 2009 a 2019 que isolaram bactérias em amostras de leite no Brasil. Como resultado, os autores encontraram maior prevalência para *Staphylococcus spp.* (81,25%) e *Streptococcus agalactiae* (50,00%) como principais agentes da mastite contagiosa, e *Escherichia coli* (43,00%), *Streptococcus dysgalactiae* e *S. uberis* (37,50%) como patógenos ambientais predominantes.

O gênero *Staphylococcus* faz parte da família Micrococcaceae. Consiste em cocos gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos e, a maioria das cepas, não possuem cápsula. A disposição das células pode variar bastante, podendo ser encontradas isoladas, em pares, em cadeias ou de maneira irregular, normalmente em arranjos semelhantes a cachos de uvas (Al-Talib; Abduljala; Hamodat, 2020).

O *S. aureus* tem como características principais ser uma bactéria anaeróbia facultativa, além de apresentar resultado positivo para os testes de coagulase e catalase. A temperatura ideal para seu crescimento varia entre 35 e 37 °C, situando-se no grupo dos microrganismos mesófilos. Uma característica notável dessa bactéria é sua capacidade de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio. Seu crescimento ocorre em ambientes com pH entre 4,5 e 9,3, sendo favorável em valores entre 6,0 e 7,0 (Bharadwaz, *et al.*, 2017).

O *S. aureus* é conhecido por sua capacidade de causar uma variedade de infecções devido a diversos fatores de virulência, que o torna altamente patogênico. Esses fatores podem ser classificados em três grandes categorias: proteínas de adesão, enzimas e toxinas. As proteínas de adesão, como as adesinas, permitem que o *S. aureus* se ligue às células hospedeiras e aos tecidos, facilitando a colonização. Enzimas como a coagulase, hialuronidase e lipase ajudam na invasão tecidual e na disseminação da bactéria pelo corpo, além de inibir mecanismos de defesa do hospedeiro (Azmi; Qrei; Abdeen, 2019; Risser; López-Morales; Nash, 2022).

Já as toxinas incluem a toxina alfa, que causa dano celular, a toxina esfoliativa, associada a doenças de pele e a enterotoxina, envolvida em intoxicações alimentares. Esses fatores de virulência são coordenados por sistemas regulatórios complexos, como o sistema agr (*accessory gene regulator*), que modula a expressão desses fatores conforme o ambiente, permitindo que o *S. aureus* se adapte rapidamente às condições do hospedeiro (Jenul; Horswill, 2019).

A resistência do *S. aureus* aos antibióticos é uma das principais preocupações de saúde pública, especialmente com a emergência de cepas resistentes, como o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). A resistência aos antibióticos ocorre devido à aquisição de genes específicos que conferem à bactéria a capacidade de inativar ou modificar o alvo dos medicamentos. No caso da resistência à meticilina, por exemplo, o gene *mecA* codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a), que tem baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas, tornando-as ineficazes (Harrison *et al.*, 2019; Lade; Kim, 2023).

Além disso, o *S. aureus* também pode produzir enzimas chamadas  $\beta$ -lactamases, que degradam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos antes que eles possam agir na parede celular bacteriana. Outro mecanismo de resistência envolve bombas de efluxo, que removem ativamente os antibióticos das células bacterianas, reduzindo a concentração do fármaco e sua eficácia (Meng, *et al.*, 2022; Santana *et al.*, 2023). O uso indiscriminado de antibióticos em ambientes hospitalares e na agricultura contribui significativamente para a seleção de cepas resistentes. Por causa desses mecanismos, o tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes se torna mais complexo, muitas vezes requerendo o uso de antibióticos mais potentes e de última linha, como a vancomicina. No entanto, cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) têm sido reportadas, evidenciando a contínua evolução da resistência e a necessidade urgente de novas terapias antibacterianas (McGuinness; Malachowa; DeLeo, 2017).

A capacidade do *S. aureus* formar biofilmes é um dos fatores críticos que dificultam o tratamento e controle do patógeno nos rebanhos leiteiros. A formação de biofilme permite que as bactérias façam adesão ao epitélio mamário, criando multicamadas de células envolvidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPSs), o que proporciona proteção contra o sistema imune do hospedeiro e a ação de antimicrobianos. Estudos mostram que a maioria das cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite são capazes de produzir biofilmes, e os genes responsáveis por essa produção, como *icaA* e *icaD*, estão presentes em uma alta porcentagem dessas cepas (Casanova *et al.*, 2016). Além disso, a presença de biofilme está associada à resistência antimicrobiana, tornando os tratamentos convencionais menos eficazes. O uso de agentes antibiofilme alternativos, como substâncias isoladas de plantas ou outras fontes, têm mostrado um efeito promissor na redução da formação de biofilmes, superando antibióticos como a gentamicina (Nader *et al.*, 2018).

Entre as opções naturais mencionadas, o grupo das bacteriocinas se destaca. São peptídeos sintetizados por ribossomos, caracterizados pela presença de aminoácidos incomuns, como lantionina e/ou metillantionina. Devido à presença elevada de lipídios nas membranas plasmáticas das bactérias gram-positivas, as bacteriocinas interagem mais facilmente, formando poros que causam o vazamento de componentes celulares (Ogaki; Gurlaneto; Maia, 2015).

Dentre as bacteriocinas, a nisina é uma das mais estudadas. Produzida por 35 das 40 cepas de *Lactococcus lactis* conhecidas, ela apresenta atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de bactérias gram-positivas. Foi descoberta em 1928 e é utilizada como conservante alimentar em mais de 50 países (Khelissa; Chihib; Gharsallaoui, 2020).

Apesar de seu amplo uso na indústria alimentícia, seu potencial antimicrobiano vem sendo estudado continuamente desde a sua descoberta (Field *et al.*, 2016). Além disso, estudos apontam que a molécula possui baixa toxicidade celular, bem como baixa resistência antimicrobiana e, por isso, se apresenta como uma potencial alternativa aos métodos convencionais de tratamento para a mastite bovina (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 SOLUÇÃO PADRÃO DE NISINA

Para obter uma solução estoque de nisina de 1.000 UI/ml, 12,5 mg de pó de nisina (pureza de 2,5%, 1000 UI/mg, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) foram dissolvidos em um balão volumétrico de 50 ml contendo 12,5 ml de HCl diluído estéril (pH 2) e após isso o volume do balão foi completado com água destilada, a solução foi então filtrada usando um dispositivo de filtração de uso único com tamanho de poro de 0,22 µm. Em seguida, foram adicionados 60µl da solução de nisina preparada na etapa anterior, 60µl de cultura bacteriana e 80µl de cultura estéril à placa de 96 poços para incubação.

#### 3.2 CEPAS UTILIZADAS

Os microrganismos utilizados na pesquisa foram cepas de *S. aureus* identificadas e isoladas de casos de mastite bovina, sendo 6 doadas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-13 USP), e 19 isoladas e identificadas por integrantes do Programa de Educação Tutorial (PET) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS/Realeza – PR), totalizando 25 cepas. Os microrganismos utilizados estavam inoculados individualmente em microtubos contendo 800 µL de caldo Mueller-Hinton (CMH) e 20% de glicerina estéril mantidos em ultrafreezer a uma temperatura de -80 °C até a realização dos testes microbiológicos (CLSI, 2024). Uma cepa padrão formadora de biofilme *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foi utilizada como controle positivo e uma cepa não formadora de biofilme *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, como controle negativo.

##### 3.2.1 Padronização da suspensão

As suspensões bacterianas, após incubadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), foram padronizadas utilizando caldo Triptona Soja (TSB) enriquecido com 1% de glicose. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro Rayleigh UV-1800 UV-Vis (Laboratório de Química da UFFS, Campus Realeza – PR) em comprimento de onda de 625 nm até que a solução atingisse um intervalo entre 0,08 e 0,13 angstrom (Å).

### 3.3 GRAU ESTIMADO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A avaliação do grau estimado de formação de biofilme foi realizada por meio da leitura da DO em microplacas de 96 poços no aparelho leitor de microplacas após as cepas padronizadas terem sido adicionadas aos poços e incubadas a 37° por 24 horas (Notcovich *et al.*, 2018).

Após a incubação das microplacas contendo as bactérias, foi realizada uma lavagem por 3 vezes utilizando 200 µL de solução salina estéril 0,1% (p/v) e a microplaca seca durante 10 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados a cada poço, 200 µL de metanol e aguardou-se 15 minutos para fixação das células. As células aderidas foram coradas com 200 µL de cristal violeta durante 15 minutos, a solução vertida e as microplacas lavadas novamente por 3 vezes utilizando 200 µL de água destilada e, em seguida, a microplaca seca durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Após a secagem, o biofilme das bactérias foi suspenso utilizando-se 240 µL de ácido acético glacial a 33% em cada poço, em seguida a leitura da DO foi realizada na leitora de microplacas em comprimento de onda de 600 nm (Stepanović *et al.*, 2000).

#### 3.3.1 Categorização das cepas quanto a produção de biofilme

As cepas foram categorizadas de acordo com os resultados médios obtidos pela DO de cada cepa em comparação com a cepa padrão não produtora de biofilme (controle negativo – CN), sendo as categorias listadas na Tabela 2 conforme método proposto por Stepanovic *et al.* (2000).

Tabela 2 — Classificação das cepas de acordo com a quantidade de biofilme produzido.

<b>Categoria da cepa formadora de biofilme</b>	<b>Resultado da leitura de DO</b>
Não formadora	DO cepa $\leq$ DO CN
Fraca formadora	DO cepa $>$ DO CN e $\leq$ 2x DO CN
Moderada formadora	DO cepa $>$ 2x DO CN e $\leq$ 4x DO CN
Forte formadora	DO cepa $>$ 4x DO CN

DO – densidade óptica, CN – controle negativo

Fonte: Stepanovic *et al.*, 2000.

Como controle foram utilizados as cepas ATCC 6538 e ATCC 12228 mencionadas anteriormente.

### 3.4 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Inicialmente foi adicionado nos poços da microplaca 60  $\mu\text{L}$  das cepas padronizadas em TSB em triplicata. Em seguida, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  da solução de nisina de concentração 1000 UI  $\text{mL}^{-1}$  e 80  $\mu\text{L}$  de solução BHI estéril em cada poço, sendo que o poço lateral foi adicionado apenas a cepa padronizada e a solução BHI para comparação de resultados.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as microplacas foram levadas à cabine de segurança, onde o conteúdo foi vertido em uma bacia e, com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril 0,1% (m/v) em todos os poços para lavagem, repetindo esse processo três vezes. Ainda na cabine, a microplaca foi deixada secar em temperatura ambiente durante 10 minutos. Após a secagem, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  metanol por 15 minutos para fixar as células. O metanol foi descartado e as células foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta por 15 minutos. Em seguida, a solução foi removida e a microplaca foi lavada três vezes com água destilada, vertendo o conteúdo e deixando secar à temperatura ambiente. Para suspender o biofilme, foram adicionados 240  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial 33% a cada poço. A leitura foi realizada na leitora de microplacas a 600 nm por três vezes.

### 3.5 CAPACIDADE DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILME JÁ FORMADO

Para avaliar a capacidade da nisina erradicar o biofilme já formado, o teste anterior foi realizado com variação de tempo na adição da nisina, ocorrendo após 24 horas da incubação das cepas, já tendo ocorrido a formação do biofilme de forma prévia (Notcovich *et al.*, 2018).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram avaliados no Software GraphPad Prism versão 8. A normalidade dos dados entre o grupo controle e o tratado com nisina foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, indicando dados não paramétricos.. Em seguida, os dados foram analisados pelo teste pareado de Wilcoxon. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Por fim, o tamanho do efeito foi calculado utilizando a fórmula proposta por Rosenthal (Fórmula 1) (1994). Após o cálculo, o valor de  $r$  foi comparado com os valores descritos por Cohen (1988) e Field (2018), sendo 0.1 considerado efeito pequeno, 0.3 efeito mediano e  $> 0.5$  efeito grande.

Fórmula 1

$$r = \frac{Z}{\sqrt{N}}$$

$r$  = Tamanho do efeito

$Z$  = Pontuação padronizada do teste

$N$  = Número de amostras

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 GRAU ESTIMADO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Das 25 cepas utilizadas, 5 foram consideradas não formadoras e 20 foram formadoras de biofilme em algum grau, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 — Grau estimado de formação de biofilme das cepas de *S. aureus* verificado pela leitura da densidade óptica em microplacas.

Formação de Biofilme	Número de cepas
Não formadora	5
Fraca formadora	9
Moderada formadora	4
Forte formadora	7

Fonte: O autor, 2024.

A capacidade de formar biofilme é uma característica importante do *S. aureus* e está associada a genes específicos que codificam componentes essenciais para a produção de adesão intercelular de exopolissacarídeos. Mirzaee, Peerani e Ghasemian (2014) identificaram os genes *icaD* e *icaC* em 46% das cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) produtoras de biofilme, sugerindo que a heterogeneidade na expressão desses genes pode influenciar o grau de formação.

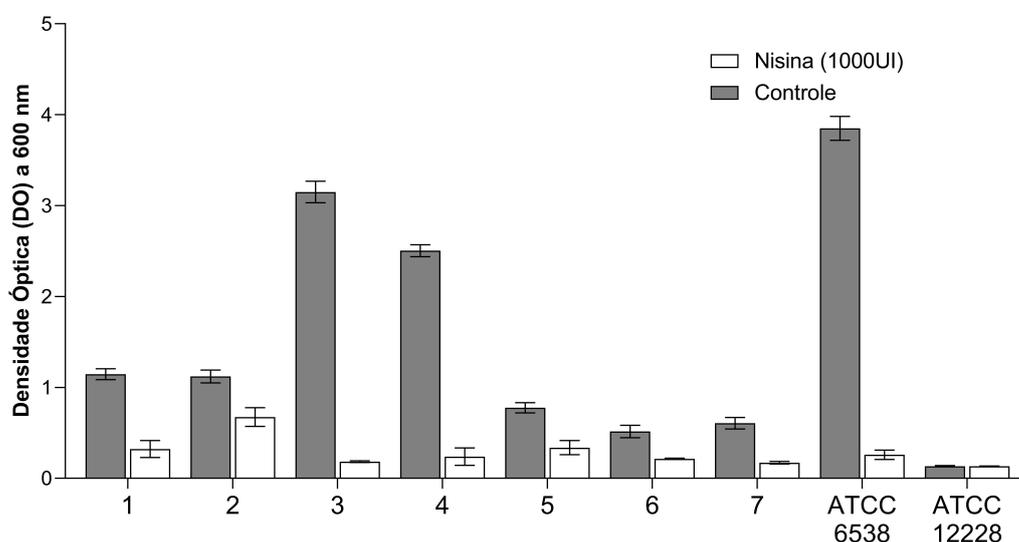
Ehterami *et al.* (2017), avaliaram a expressão dos genes citados anteriormente em cepas de *S. aureus* e relataram variações na capacidade de formar biofilme, sugerindo que a expressão dos genes tem grande influência e pode explicar a formação de biofilmes em níveis variados.

A correlação da formação de biofilme com os genes *icaA* e *icaD* é bem documentada na literatura. A presença desses genes aumenta a virulência e a capacidade de resistência de *S. aureus*, o que é um desafio significativo no controle de infecções. Os resultados do presente estudo estão alinhados com as evidências de que a maioria das cepas de *S. aureus* possui capacidade variada de formar biofilme, que foi de 80%, 20 de 25 bactérias testadas. O resultado destaca a relevância da busca por estratégias que visem bloquear a expressão ou função dessas características para combater infecções persistentes.

## 4.2 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

O teste de inibição da formação de biofilme na presença de nisina foi realizado com as bactérias fortes formadoras ( $n = 7$ ), e as cepas padrões. A Figura 1 demonstra o resultado entre as bactérias fortes formadoras e os controles positivo e negativo, indicando que a nisina foi capaz de reduzir a produção de biofilme de forma bem pronunciada em cada uma das 07 cepas de *S. aureus* testadas, bem como na cepa controle positivo (ATC6538).

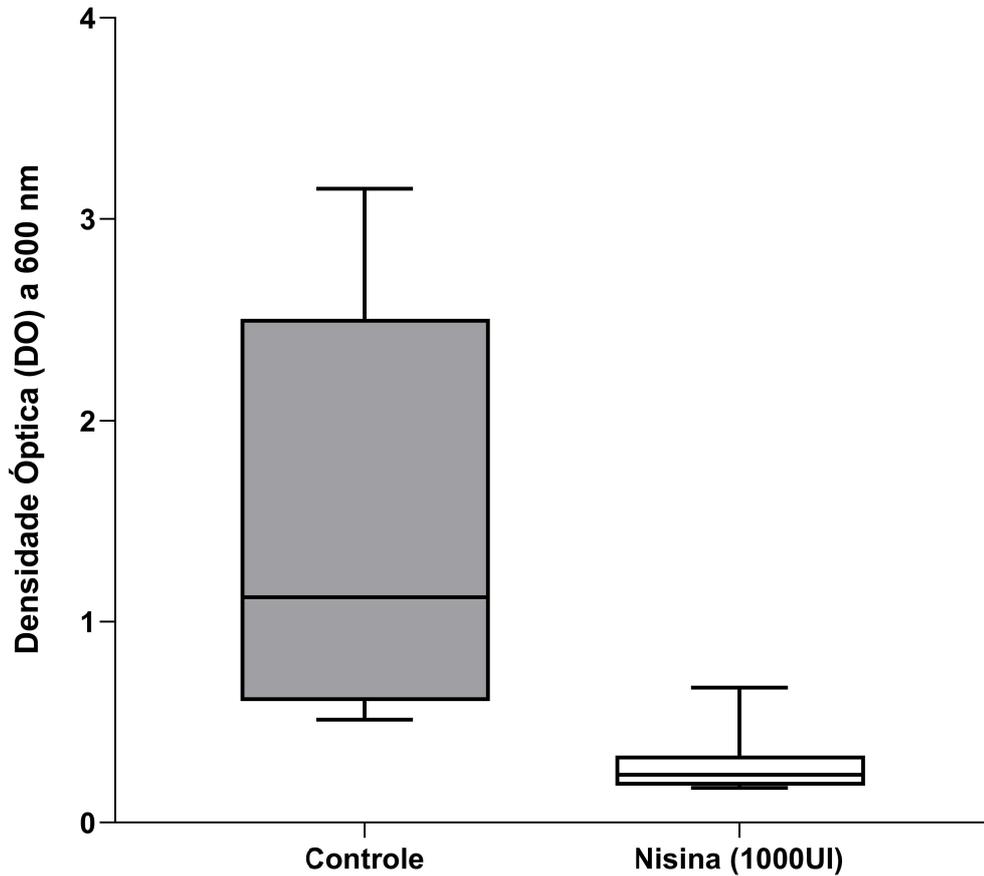
Figura 1 — Efeito da nisina contra formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: O autor, 2024.

Ademais, pode ser observado na Figura 2, que após teste pareado não paramétrico de Wilcoxon a nisina apresentou um resultado significativamente menor na DO do que o grupo controle ( $p < 0,0001$ ), indicando seu potencial efeito em inibir a formação do biofilme bacteriano.

Figura 2 — Efeito inibitório de 1000 UI de nisina sobre a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* fortemente formadoras (n=7 cepas). Os dados estão apresentados na forma de mediana ± intervalo interquartil. \* Indica diferença significativa em relação ao grupo controle.



Fonte: O autor, 2024.

A análise revelou uma redução significativa na formação de biofilme com a utilização da nisina ( $z = 2,366$ ;  $p < 0,0001$ ), obtendo-se como resultado do tamanho do efeito  $r = 0.63$ , o qual pode ser considerado um tamanho de efeito grande (Cohen, 1988; Field 2018). Field *et al.* (2016), relataram em seu estudo utilizando a nisina contra biofilmes de *Staphylococcus* spp., que ela tem efeito sobre as células planctônicas da colônia, células livres que saem do biofilme na fase de dispersão para colonizarem outro local do hospedeiro e gerar novos biofilmes.

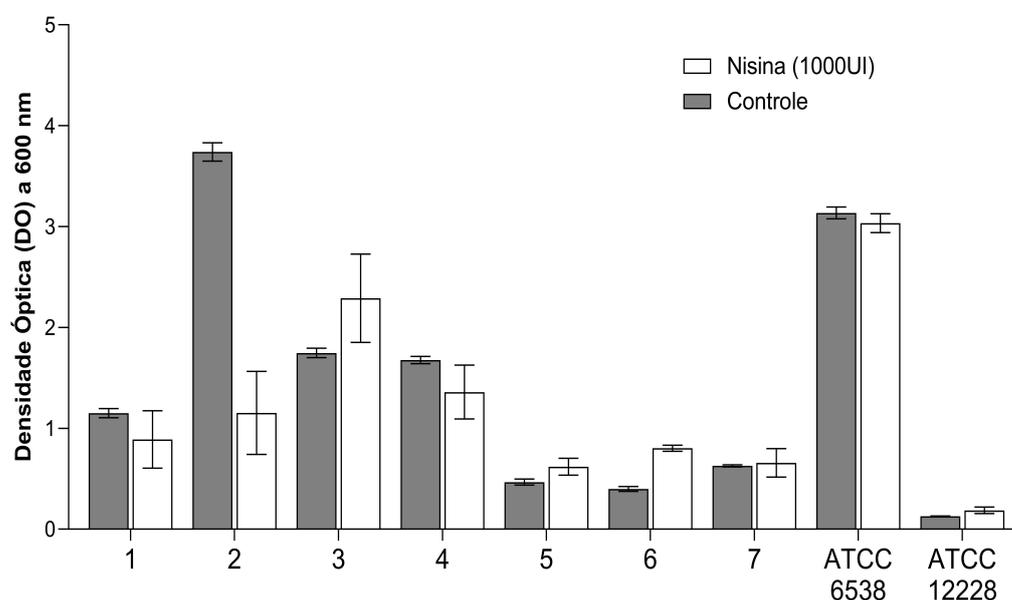
Outros estudos indicam que a nisina tem a capacidade de acessar a parte mais profunda da matriz de biofilme antes de sua formação, impedindo a oclusão da matriz de exopolissacarídeos (EPS), deixando os patógenos mais susceptíveis aos antimicrobianos comerciais (Rodrigues; Andre; Vanetti, 2024).

Segundo Godoy-Santos *et al.* (2019), a nisina causa a perda da integridade da membrana das células bacterianas dentro do biofilme, o que leva à morte das bactérias. Além disso as células planctônicas (bactérias livres) são mais sensíveis à nisina em comparação com as células sésseis (dentro do biofilme). Esse resultado sugere que o estado de adesão das bactérias afeta sua resistência aos tratamentos com antimicrobianos, sendo as células planctônicas, responsáveis pela dispersão do biofilme, as mais suscetíveis ao ataque direto da nisina.

### 4.3 ERRADICAÇÃO DO BIOFILME JÁ FORMADO

Além disso, a concentração de 1000 UI de nisina também foi capaz de erradicar o biofilme pré-formado durante 24 horas em algumas cepas de *S. aureus*, sendo tal efeito mais expressivo na cepa número 2, além de um efeito menor nas cepas 1 e 4 e um efeito mínimo na cepa controle positivo (ATC6538), cujos resultados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 — Efeito de 1000 UI de nisina sobre a erradicação de biofilme pré-formado em cepas de *Staphylococcus aureus* fortemente formadoras.

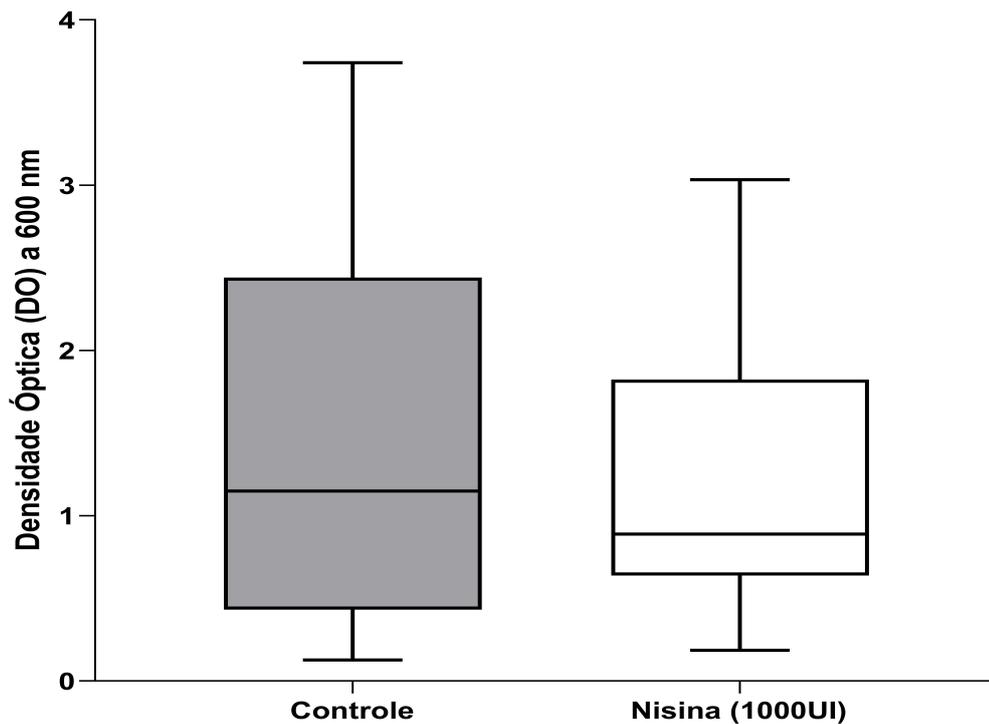


Fonte: O autor, 2024.

Ainda, quando aplicado o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon representado na figura 5, foi identificada uma redução significativa na DO em relação ao grupo controle ( $z = -0,330$ ;  $p = 0,0395$ ), indicando seu potencial efeito em inibir a formação do biofilme bacteriano. Contudo, após análise do tamanho do efeito  $r = 0.1$ , ou seja, apesar de uma

diferença estatística significativa entre os grupos, ao realizar o cálculo do tamanho do efeito  $r$  foi considerado um efeito pequeno de acordo com Cohen (1988).

Figura 4 — Efeito de 1000 UI de nisina sobre a erradicação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus* fortemente formadoras (n=7 cepas). Os dados estão apresentados na forma de mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \* Indica diferença significativa em relação ao grupo controle.



Fonte: O autor, 2024.

Pinheiro *et al.* (2021), avaliou a nisina pura e combinada com outros agentes, como aminoácidos D, para combater biofilmes em modelos endodônticos previamente formados. A nisina isolada ou em combinação com aminoácidos D mostrou-se ineficaz para reduzir a viabilidade dos biofilmes, sendo necessário o uso de clorexidina para obter algum efeito significativo. Field *et al.* (2016), investigou o uso de nisina e suas variantes combinadas com antibióticos para erradicar biofilmes de *S. aureus* formados anteriormente. Embora a combinação tenha mostrado uma redução na viabilidade, a nisina sozinha não foi eficaz na erradicação completa dos biofilmes estabelecidos devido à dificuldade em penetrar e agir nas bactérias ali fixadas.

A eficácia da nisina como agente antimicrobiano foi significativamente reduzida devido à adaptação fisiológica que ocorre nas células bacterianas quando organizadas em biofilmes, em comparação com células em estado planctônico. Enquanto as células planctônicas são mais vulneráveis e diretamente expostas aos agentes antimicrobianos, as

células no biofilme desenvolvem uma série de mecanismos adaptativos que as tornam mais resistentes, por isso a nisina se demonstra mais eficaz para inibição da formação do que para erradicação pós-formação do biofilme (Godoy-Santos *et al.*, 2018; Godoy-Santos *et al.*, 2019).

## 5 CONCLUSÃO

Por meio do presente estudo foi possível concluir que a nisina apresenta potencial de impedir a formação do biofilme por cepas de *S. aureus* fortes formadoras, isoladas de mastite bovina. Entretanto, a nisina diminui de forma sutil o biofilme já formado pelas mesmas cepas e aderido na superfície.

Diante disso, são necessários novos estudos para desenvolver estratégias mais eficazes no uso da nisina contra biofilmes já estabelecidos, considerando sua complexidade e resistência. Deve-se investigar tanto concentrações otimizadas de nisina quanto combinações com outros antimicrobianos e métodos de liberação controlada, a fim de potencializar os efeitos dessa bacteriocina. Alternativas promissoras incluem o uso de derivados da nisina e sua aplicação junto a tecnologias emergentes, como nanocarreadores e adjuvantes naturais, visando a erradicação de biofilmes resistentes. Essas abordagens são especialmente importantes em ambientes clínicos e industriais, onde a resistência bacteriana representa um desafio significativo, como no caso da mastite bovina.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKHADER, A.; MEGANATH, K.; VIGNESH, S.; ROJAN, P.; MUHAMMED, E.; RATHISH, R.; ASAF, V.; DINESH, C. Comparison of California Mastitis Test and somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in crossbred cattle. **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.51966/jvas.2022.53.4.725-730>.
- ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 479–491, 2018. DOI: [10.1016/j.cvfa.2018.07.003](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003).
- ALHUSSIEN, M.; PANDA, B.; DANG, A. A Comparative Study on Changes in Total and Differential Milk Cell Counts, Activity, and Expression of Milk Phagocytes of Healthy and Mastitic Indigenous Sahiwal Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.670811>.
- AL-TALIB, Nuha A.; ABDULJALA, Maryam H.; HAMODAT, Zahraa Mohammed Ali. A Review on *Staphylococcus* sp. and its pathogens. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 755–759, 2020. Disponível em: <https://ijrps.com/home/article/view/603>.
- AZMI, K.; QREI, W.; ABDEEN, Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. **BMC Genomics**, v. 20, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5929-1>.
- BHARADWAZ, M.; MANNA, P.; DAS, D.; DUTTA, N.; KALITA, J.; UNNI, B.; DEKA BORUAH, H. P. Isolation, purification, and characterization of staphylocoagulase, a blood coagulating protein from *Staphylococcus* sp. MBBJP S43. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1312–1321, 2017. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.05.005](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.005).
- BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Anuário do leite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2019. p. 104.
- BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Como identificar a vaca com mastite em sua propriedade: cartilhas elaboradas conforme a metodologia e-Rural**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2015. p. 40.
- BREEN, J. Reducing antibiotic use in the control of mastitis in dairy herds. **Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR202116014>.
- CALVINHO, L.; DALLARD, B. *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infections in dairy cows: Pathogen-specific characteristics. **CABI Reviews**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1079/cabireviews.2023.0007>.
- CASANOVA, V. P.; APPIO, J.; KOHL, E.; MICHAELSEN, T. R.; PAIM, D. S.; BRUNETTO, T. R.; GIRARDINI, L. K. Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial

susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1369, 2016. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n3p1369.

CEOTTO-VIGODER, H.; MARQUES, S. L.; SANTOS, I. N.; ALVES, M. D.; BARRIAS, E. S.; POTTER, A.; ALVIANO, D. S.; BASTOS, M. C. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 101-114, jul. 2016. DOI: 10.1111/jam.13136.

CHENG, W. N.; HAN, S. G. Bovine Mastitis: Risk Factors, Therapeutic Strategies, and Alternative Treatments—A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**. 7th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nd ed. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, 1988.

DOBRUT, A.; WÓJCIK-GRZYBEK, D.; MŁODZIŃSKA, A.; PIETRAS-OŻGA, D.; MICHALAK, K.; TABACKI, A.; MROCZKOWSKA, U.; BRZYCHCZY-WLOCH, M. Detection of immunoreactive proteins of *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* isolated from cows with diagnosed mastitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.987842>.

EHTERAMI, P.; RAJABPOUR, M.; JAHROMY, S. H.; NOORBAKHS, F. Evaluation expression *icaABCD* biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* by Real-time PCR. **Journal of Clinical and Analytical Medicine**, v. 8, p. 468-471, 2017.

FIELD, A. P. **Discovering statistics using IBM SPSS Statistics**. 5th ed. Sage, 2018.

FIELD, D.; O'CONNOR, R.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against *Staphylococcus* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00508.

FOROUTAN, S.; ESLAMPOUR, M. M.; EMANEINI, M.; JABALAMELI, F.; AKBARI, G. H. Characterization of Biofilm Formation Ability, Virulence Factors and Antibiotic Resistance Pattern of *Staphylococcus aureus* Isolates from Subclinical Bovine Mastitis. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v. 16, n. 2, p. 144-154, 2022.

GODOY-SANTOS, F.; PITTS, B.; STEWART, P.; MANTOVANI, H. Nisin penetration and efficacy against *Staphylococcus aureus* biofilms under continuous-flow conditions. **Microbiology**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000804>.

GODOY-SANTOS, F.; PITTS, B.; STEWART, P.; MANTOVANI, H. Nisin penetrates *Staphylococcus aureus* biofilms but shows differences in killing effects against sessile and planktonic cells. **bioRxiv**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/303636>.

- GOULART, D.; MELLATA, M. *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928346>.
- HARRISON, E.; BA, X.; COLL, F.; BLANE, B.; RESTIF, O.; CARVELL, H.; KÖSER, C.; JAMROZY, D.; REUTER, S.; LOVERING, A.; GLEADALL, N.; BELLIS, K.; UHLEMANN, A.; LOWY, F.; MASSEY, R.; GRILO, I.; SOBRAL, R.; LARSEN, J.; LARSEN, A.; LUNDBERG, C.; PARKHILL, J.; PATERSON, G.; HOLDEN, M.; PEACOCK, S.; HOLMES, M. Genomic identification of cryptic susceptibility to penicillins and  $\beta$ -lactamase inhibitors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1680-1691, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0471-0>.
- IBRAHIM, E.; ARAFA, A.; DORGAM, S.; EID, R.; ATTA, N.; EL-DABAE, W.; GABER, E. Molecular characterization of genes responsible for biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Veterinary World**, v. 15, p. 205-212, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.205-212>.
- JENUL, C.; HORSWILL, A. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>.
- KAOUICHE-ADJLANE, S.; MANSOUR, L. Evaluation of the Udders Health Status through Somatic Cell Count and the Californian Mastitis Test in Algerian Dairy Farms. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.18805/ajdfr.dr-173>.
- KHELISSA, S.; CHIHIB, N.; GHARSALLAOUI, A. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 465-480, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>.
- LADE, H.; KIM, J. Molecular Determinants of  $\beta$ -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. **Antibiotics**, v. 12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091362>.
- McGUINNESS, W. A.; MAŁACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, p. 269-281, 2017.
- MELLO, P.; RIBOLI, D.; MARTINS, L.; BRITO, M.; VICTÓRIA, C.; ROMERO, L.; CUNHA, M. *Staphylococcus* spp. Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Regions of Brazil: Molecular Typing and Biofilm Gene Expression Analysis by RT-qPCR. **Antibiotics**, v. 9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120888>.
- MENEZES, H. M.; MILHOMEM, T. F.; DA SILVA, M. de A. Mastite em vacas: cuidado e prevenção. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 2, p. 7029–7038, 2023. DOI: [10.34119/bjhrv6n2-205](https://doi.org/10.34119/bjhrv6n2-205).
- MENG, F.; NIE, T.; LYU, Y.; LYU, F.; BIE, X.; LU, Y.; ZHAO, M.; LU, Z. Plantaricin A reverses resistance to ciprofloxacin of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting efflux pumps. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 10, p. 4818-4833, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16158>.

MERONI, G.; SORA, V.; MARTINO, P.; SBERNINI, A.; LATERZA, G.; ZAGHEN, F.; SOGGIU, A.; ZECONI, A. Epidemiology of Antimicrobial Resistance Genes in *Streptococcus agalactiae* Sequences from a Public Database in a One Health Perspective. **Antibiotics**, v. 11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091236>.

METZGER, S. A.; HERNANDEZ, L. L.; SUEN, G.; RUEGG, P. L. Understanding the Milk Microbiota. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 427–438, 2018. DOI: 10.1016/j.cvfa.2018.06.003.

MIRZAEI, M.; PEERAYEH, S. N.; GHASEMIAN, A. Detection of *icaABCD* Genes and Biofilm Formation in Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Iranian Journal of Pathology**, v. 9, p. 257-262, 2014.

MOSCA, F.; FLORENTINO, C.; RIAL, C.; LAPLACETTE, A.; MASIC, A.; BORCHERS, M.; ASPER, D.; CAIXETA, L. Assessment of the relationship between differential somatic cell count and presence of subclinical mastitis. **American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21423/aabppro20228694>.

NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; TALEB-CONTINI, S. H.; AMARAL, L. A.; PEREIRA, A. M. S. Atividade antibiofilme de substâncias de Croton urucurana em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1713–1719, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-5034.

NOTCOVICH, S.; DENICOLO, G.; FLINT, S.H.; WILLIAMSON, N.B.; GEDYE, K.; GRINBERG, A.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. Biofilm-Forming Potential of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in New Zealand. **Vet. Sci.** 2018, 5, 8. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010008>

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015. DOI: 10.1590/1981-6723.2215.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA, E.; ROSSI, R. E.; FODITSCH, C.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, e85904, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085904.

PATEL, H.; SKOK, C.; DEMARCO, A. Peripheral Edema: Evaluation and Management in Primary Care. **American Family Physician**, v. 106, n. 5, p. 557-564, 2022.

PINHEIRO, E.; KARYGIANNI, L.; ATTIN, T.; THURNHEER, T. Antibacterial Effect of High-Purity Nisin Alone and in Combination with D-Amino Acids or Chlorhexidine in an Endodontic-Like Biofilm Model. **Antibiotics**, v. 10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020149>.

REINERS, J.; LAGEDROSTE, M.; GOTTSSTEIN, J.; ADENIYI, E.; KALSCHUEER, R.; POSCHMANN, G.; STÜHLER, K.; SMITS, S.; SCHMITT, L. Insights in the Antimicrobial Potential of the Natural Nisin Variant Nisin H. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573614>.

RISSER, F.; LÓPEZ-MORALES, J.; NASH, M. Adhesive Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Resist Digestion by Coagulation Proteases Thrombin and Plasmin. **ACS Bio & Med Chem Au**, v. 2, p. 586-599, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomedchemau.2c00042>.

RODRIGUES, R. C.; et al. Subinhibitory Concentrations of Nisin Enhance Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus* and Increase Mortality in *Galleria mellonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 77, n. 7, jul. 2024, p. ovae064. DOI: <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae064>.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, n. 3, p. 257–264, 2015. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.006.

ROSENTHAL, R. Parametric measures of effect size. In: COOPER, H.; HEDGES, L. V. **The handbook of research synthesis**. New York: Russell Sage Foundation, 1994. p. 231-244.

RUEGG, P. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017. DOI: 10.3168/jds.2017-13023.

RUEGG, P. Clinical mastitis treatment decisions. **American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21423/aabppro20238740>.

SANTANA, J. E. G.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; GONÇALVES ALENCAR, G.; SIQUEIRA, G. M.; SAMPAIO ALVES, D.; MOURA, T. F.; TINTINO, S. R.; DE MENEZES, I. R. A.; RODRIGUES, J. P. V.; GONÇALVES, V. B. P.; NICOLETE, R.; EMRAN, T. B.; LIMA, C. M. G.; AHMAD, S. F.; COUTINHO, H. D. M.; DA SILVA, T. G. Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and  $\alpha$ -Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7649, 2023. DOI: 10.3390/molecules28227649.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000. DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6.

VEIGA, A. P.; CUNHA N. A.; SOUZA, F. E. E.; TAVARES, C. R. C. Micro-organismos Isolados de Mastite Bovina e em Leite Cru no Brasil. **UNICIÊNCIAS**, v. 24, n. 1, p. 58–64, 2021. DOI: 10.17921/1415-5141.2020v24n1p58-64.

WOLLOWSKI, L.; HEUWIESER, W.; KOSSATZ, A.; ADDIS, M.; PUGGIONI, G.; MERIAUX, L.; BERTULAT, S. The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 2020. DOI: 10.3168/jds.2020-18539.