

FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LETICIA FERREIRA GUEDES LEITE

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE CÃES NO MUNICÍPIO DE VOLTA REDONDA, RJ**

VOLTA REDONDA

2018

FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE CÃES NO MUNICÍPIO DE VOLTA REDONDA, RJ

Artigo apresentado ao Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado do UniFOA como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aluno:

Leticia Ferreira Guedes Leite

Orientador:

Prof. Dr. Renato da Silva Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Sanches Pereira

VOLTA REDONDA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecária: Alice Tacão Wagner - CRB 7/RJ 4316

L533a Leite, Leticia Ferreira Guedes.
Análise da produção de biofilme por *Staphylococcus spp.*, isolados de cães no Município de Volta Redonda, RJ. / Leticia Ferreira Guedes Leite. – Volta Redonda: UniFOA, 2018.

23 p. II.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato da Silva Teixeira

Monografia (TCC) – UniFOA / Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, 2018.

1. Ciências Biológicas - TCC. 2. Micro-organismos - biofilme. 3. Cães – micro-organismos. I. Teixeira, Renato da Silva. II. Centro Universitário de Volta Redonda. III. Título.

CDD 570



Fundação Oswaldo Aranha



FOLHA DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: Análise da produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. Isolados de cães no município de Volta Redonda, RJ.

Elaborado por Leticia Ferreira Guedes Leite apresentado publicamente perante a Banca Avaliadora, como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado.

Aprovada em 01 de NOVEMBRO de 2018

Banca Avaliadora:

.....
Professor Orientador

Renato da Silva Teixeira, Dr. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

.....
Professor Co-orientador

Carlos Alberto Sanches Pereira, Dr. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

.....
Professor Avaliador

Fabrício Santos da Silva, Mestre, Petnestic Centro de diagnóstico, estudos e pesquisas em Medicina Veterinária.

Campus Universitário Oezio Galotti
Sede Administrativa
Av. Paulo Erlei Alves Abrantes, n.º 1.325 - Três Poços
27240-560 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3340-8400

Campus Universitário João Pessoa Fagundes
Rua 28, n.º 619 - Tangerinal
27262-340 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3348-1441

Campus Universitário Porfirio José de Almeida
Av. Lucas Evangelista, n.º 862 - Alarrado
27215-630 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3338-2764/ 3338-2925

Campus Universitário Colina
Rua Nossa Sra. das Graças, n.º 273 - Colina
27253-610 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3340-8437

Campus Universitário José Vinciprova
Shopping 16
Rua 23 B, n.º 39 - Vila Santa Cecília
27260-130 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3348-5991

Campus Universitário Leonardo Mollica
Avenida Jaraguá, n.º 1.084 - Retiro
27277-130 - Volta Redonda - RJ.
Tel.: (24) 3344-1850

Aos meus pais Claudia e Edmilson, por todo o apoio, força e carinho. Sem o esforço de vocês não seria capaz de completar mais uma etapa na minha vida.

Agradeço à Deus, por ter me concedido saúde e forças durante os momentos mais difíceis. Aos meus pais, que sempre foram minha fonte de inspiração. Agradeço aos professores, especialmente Prof. Dr. Renato, responsável pela orientação do trabalho. Aos colegas Matheus, Brenda e Gabrielle, que participaram do projeto de iniciação científica. Ao Prof. Dr. Carlos, pelas oportunidades que me ofereceu, mostrando-me que posso ser mais do que imagino e por todas as palavras de apoio. Aos meus amigos, Felipe, Marcely e Letícia, que dividiram essa caminhada comigo. À minha amiga Ana Cecília, por toda a ajuda que carinhosamente me deu. Agradeço ao PETNOSTIC, por ter permitido a realização do projeto, cedendo gentilmente as amostras.

“As a woman I have no country. As a woman I want no country. As a woman my country is the whole world.”

Virginia Woolf

RESUMO

Biofilmes são definidos como comunidades microbianas sustentadas por substâncias poliméricas extracelulares, aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. Oferecem maior proteção às células envolvidas, dificultando a ação de drogas antimicrobianas e/ou das células de defesa do organismo hospedeiro, além de facilitarem a transmissão de genes de resistência, prejudicando, dessa forma, o tratamento de algumas infecções. Este trabalho apresenta como objetivo a análise da produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. em cães no município de Volta Redonda, RJ. Amostras foram cedidas gentilmente pelo PETNOSTIC (Centro de Diagnósticos, Estudos e Pesquisas em Medicina Veterinária). Utilizaram-se 20 cepas isoladas de diferentes sítios anatômicos, como, pele, ouvido, abdômen e mama. Realizou-se a análise através de dois métodos: semeadura em ágar vermelho Congo e método espectrofotométrico. Cepas apresentando colônias vermelhas foram interpretadas como negativas, e as negras, positivas; pelo segundo método, as categorias foram: não aderente, fracamente aderente e fortemente aderente. Foram identificados, dentre as amostras, 65% como *Staphylococcus aureus*, 25% como *S. pseudintermedius* e 10% como *S. intermedius*. Pela técnica do vermelho Congo, 10,0% das cepas foram produtoras de biofilme, enquanto que através do método espectrofotométrico, 55,0% foram positivas. Os sítios anatômicos que apresentaram isolados positivos foram pele e ouvido, sendo que *S. aureus* demonstrou prevalência em ambos. Constata-se que cepas produtoras de biofilme também podem ser encontradas em animais de companhia, que muitas vezes atuam como reservatório desses micro-organismos. Sendo assim, conclui-se que a investigação sobre a produção de biofilme possibilita melhor orientação quanto ao emprego do tratamento adequado de infecções em animais.

Palavras-chave: Biofilme. Micro-organismos. Cães.

ABSTRACT

Biofilms are defined as microbial communities supported by extracellular polymeric substances, adhered to biotic or abiotic surfaces. They offer a greater protection to the involved cells, hampering the actions of antimicrobial drugs and/or defense cells of the host's organism, besides facilitating the transmission of resistance genes, thereby impairing the treatment of some infections. This work aims to analyze the production of biofilm by *Staphylococcus* spp. in dogs in the city of Volta Redonda, RJ. Samples were gently granted by PETNOSTIC (Center of Diagnosis, Studies and Researches in Veterinary Medicine). Twenty isolated strains were used, from different anatomical sites, such as skin, ear, abdomen and breast. The analysis was performed through two methods: seeding in Congo red agar and spectrophotometric method. Strains presenting red colonies were interpreted as negatives and black ones, positives; by the second method, the categories were: non adherent, weakly adherent and strongly adherent. Among the samples were identified 65% as *Staphylococcus aureus*, 25% as *S. pseudintermedius* and 10% as *S. intermedius*. By the technique of Congo Red, 10,0% of the strains were biofilm producers, while through the spectrophotometric, 55,0% were positives. The anatomical sites that presented isolated positives were skin and ears, with *S. aureus* demonstrating prevalence in both. It is noted that biofilm producing strains can also be found in companion animals, which often act as reservoirs of these microorganisms. Therefore, one may conclude that research on biofilm production provides better guidance as to the best treatment of infections in animals.

Keywords: Biofilm. Microorganisms. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Prevalência das espécies isoladas em relação aos sítios anatômicos de cães14
- Figura 2 – Relação entre os sítios anatômicos de cães e as espécies produtoras biofilme..... 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre os resultados obtidos pelo Ágar Vermelho Congo e pelo método espectrofotométrico	16
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	12
2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	13
2.2.1 Método por Semeadura em Ágar Vermelho Congo.....	13
2.2.2 Método Espectrofotométrico.....	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são caracterizados como comunidades microbianas, estruturadas a partir da adesão de micro-organismos em superfícies bióticas ou abióticas que permanecem imobilizados através da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), representam, portanto, o modo de vida sésil de tais micro-organismos (OLIVEIRA et al., 2010).

A formação do biofilme tem como primeira etapa a adesão reversível, na qual as células em estado planctônico são atraídas para as superfícies sólidas. Com a adesão celular, aumenta-se a produção de moléculas sinalizadoras responsáveis pela regulação do biofilme, caracterizando o quorum sensing, que funciona como meio de comunicação entre as células. O próximo estágio é a adesão irreversível, em que os micro-organismos fortalecem as ligações à superfície. Nessa fase, as EPS estão consolidadas, com a presença de canais de água, que permitem o fluxo de substâncias no biofilme. Em algumas situações, ocorre a dissociação de células ou agregados do biofilme, permitindo a colonização em novos lugares (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Infecções associadas à produção de biofilmes possuem importância quando se trata de saúde pública, pois dificultam a ação de drogas antimicrobianas e das células de defesa de um organismo, o que favorece a sobrevivência dos micro-organismos (OLIVEIRA; CUNHA, 2008). Além disso, a interação entre as células bacterianas facilita a troca de material genético, fato que permite disseminar fatores de resistência, podendo levar à cronicidade das infecções (KOSTAKIOTI; HADJIIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013).

O gênero *Staphylococcus* são bactérias gram-positivas, podendo ser encontradas isoladas, em cadeias curtas, ou até em aglomerados não regulares. São produtoras de catalase, e quanto ao metabolismo, anaeróbicas facultativas (ALMEIDA, 2011). Algumas espécies produzem uma enzima chamada coagulase, favorecendo a ativação da protrombina (SMELTZER; BEENKEN, 2016). As produtoras da enzima são denominadas coagulase positivos e aquelas que não a produzem, coagulase negativos (PENNA, 2013).

Cepas resistentes também podem ser encontradas em animais de companhia, que funcionam como um reservatório desses micro-organismos. Cães e gatos apresentam um potencial zoonótico de transmissão de patógenos, uma vez que os antimicrobianos utilizados em medicina veterinária são semelhantes aos de uso humano, contribuindo para a resistência bacteriana (TUNON; SILVA; FAIERSTEIN, 2008).

A maioria dos trabalhos leva em consideração animais de produção, sendo escasso o número de estudos em cães. Entretanto a identificação dos mecanismos de patogenicidade desses micro-organismos é importante para a correta aplicação da antibioticoterapia (SANTOS et al., 2007).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de cães do município de Volta Redonda, RJ.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Um total de 20 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de diferentes sítios anatômicos de cães durante o período de dezembro de 2017 a maio de 2018 foram cedidas pelo PETNOSTIC (Centro de Diagnósticos, Estudos e Pesquisas em Medicina Veterinária) e identificadas por APISthapy[®]. Para esse trabalho, foram utilizadas como controle, cepas padrão: *S. epidermidis* - ATCC 35984 (+) e *S. epidermidis* - ATCC 12228 (-).

As cepas foram armazenadas em criotubos a -20° C em caldo infusão cérebro-coração com 20% de glicerol. Para a realização dos testes, tais cepas foram ativadas 3 vezes em caldo infusão cérebro-coração.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para detectar a produção de biofilme, os *Staphylococcus* foram testados por meio de dois processos: semeadura em ágar vermelho Congo, seguindo o método elaborado por Freeman; Falkiner; Keane (1989) e o método espectrofotométrico apresentado por Christensen et al. (1985), ambos citados por Bernardi; Pizzolitto; Pizzolitto (2007).

2.2.1 Método por Semeadura em Ágar Vermelho Congo

Para a realização da semeadura, o meio de cultura ágar Vermelho Congo foi composto por caldo infusão cérebro-coração 37 g/L, ágar 10 g/L, sacarose 50 g/L e corante vermelho Congo 0,8 g/L. O preparo do corante vermelho Congo foi feito como solução aquosa, autoclavado separadamente por 15 minutos e adicionado ao ágar ao atingir a temperatura de 55°C.

A semeadura foi realizada e as placas foram incubadas à 37° C em aerobiose por 24 horas, seguido por incubação pelo período de 18 horas em temperatura ambiente. Colônias negras foram interpretadas como biofilme positivo, por outro lado, aquelas que se apresentaram vermelhas, como biofilme negativo.



Fonte: autor

2.2.2 Método espectrofotométrico

Para o método espectrofotométrico, as cepas foram cultivadas em 3,0 mL de caldo triptona soja suplementado com 0,25% de glicose e incubadas por uma noite a 37 °C. A diluição e padronização da cultura em 10^5 UFC/mL foi realizada no mesmo meio. Desta suspensão, alíquotas de 0,2 mL foram inoculadas em microplaca de poliestireno esterilizada com 96 poços e fundo em U, seguido por incubação pelo período de 18 horas a 37°C.

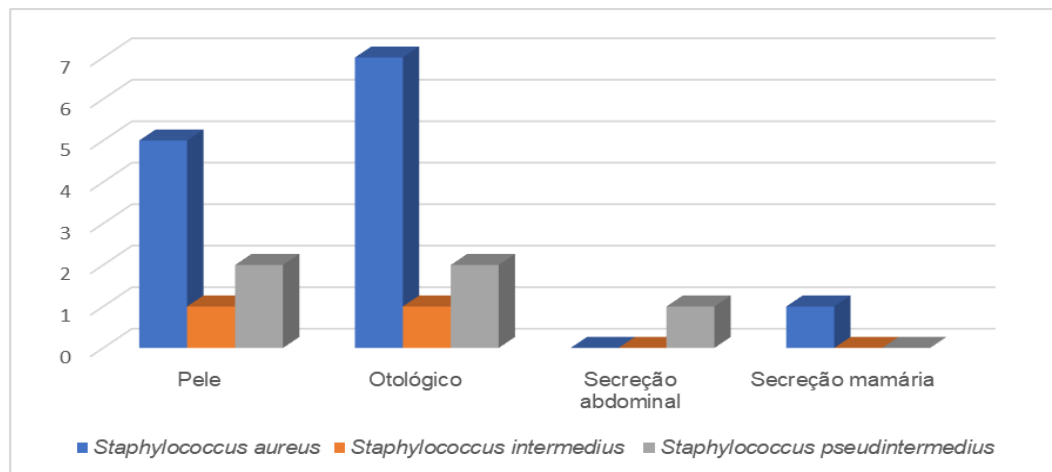
Os poços foram aspirados através de pipeta, lavados quatro vezes com 0,2 mL de tampão fosfato salina (pH 7,2), secos à 60°C por uma hora, corados com solução Cristal Violeta de Gram por um minuto, lavados com água, adicionando-se em seguida solução a 1% de dodecil sulfato de sódio.

Posteriormente foi realizado a leitura da densidade óptica (D.O), utilizando-se leitor para ELISA em comprimento de onda 570nm. Como controle negativo, caldo triptona esterilizado foi utilizado. As leituras foram feitas em triplicata, realizando-se a média para interpretação dos valores da densidade. A classificação da aderência bacteriana foi dividida em três categorias: não aderente (D.O 0,120 nm), fracamente aderente (D.O 0,120 a 0,240 nm) e fortemente aderente (D.O 0,240 nm), de acordo com a intensidade da cor azul presente em cada um dos poços.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 20 isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes sítios anatômicos de cães durante o período de dezembro de 2017 a maio de 2018, gentilmente cedidos pelo PETNOSTIC, 13 (65%) foram identificados como *S. aureus*, 2 (10,0%) como *S. intermedius* e 5 (25,0%) como *S. pseudintermedius*. A figura 1 mostra a relação das espécies isoladas e os respectivos sítios anatômicos.

Figura 1: Prevalência das espécies isoladas em relação aos sítios anatômicos de cães



Fonte: elaborado pelo autor

Apesar das bactérias do gênero *Staphylococcus* serem pertencentes da microbiota normal de mamíferos, presentes na pele e mucosas (WERCKENTHIN, et al., 2001), algumas cepas podem estar relacionadas a algumas infecções.

Em revisão feita por Werckenthin et al (2001), relaciona-se *Staphylococcus intermedius* como patógeno responsável por pioderma em cães e gatos, além de também estar presente em doenças como otite externa, piometra e outras infecções.

Em trabalho conduzido por Hoekstra e Paulton (2002), verificou-se maior frequência de *Staphylococcus intermedius* (60,7%) quando comparado com *Staphylococcus aureus* (39,3%), de 2206 amostras isoladas de diferentes sítios anatômicos de cães, como ouvido, pele, urina, abscessos e extremidades

reprodutivas. Lima et al (2012), demonstra que *Staphylococcus pseudintermedius* foi a espécie mais encontrada em isolados de lesões na pele de cães.

Todavia, no presente estudo, nota-se predomínio de *Staphylococcus aureus* entre os isolados. Pode-se relacionar tal resultado com a pequena quantidade de amostras obtidas de pele. O predomínio de *Staphylococcus aureus* também pôde ser observado em amostras otológicas. Lilenbaum et al (2000) descreveu a distribuição de espécies de *Staphylococcus* em otite canina, encontrando entre coagulase positivas, prevalência de *Staphylococcus aureus* (25%) sobre *Staphylococcus intermedius* (13,6%), do total de 44 amostras.

Em relação à produção de biofilme, o teste por Ágar Vermelho Congo (AVC) demonstrou que duas cepas (10,0%) foram positivas para a produção de biofilme, sendo as mesmas, também positivas no método espectrofotométrico.

Em contrapartida, o método espectrofotométrico demonstrou que 55% dos isolados foram capazes de produzir biofilme, sendo 35% classificadas como fracamente aderentes, onde as médias da D.O variou entre 0,120 a 0,240 nm e 20% fortemente aderentes, tendo médias de D.O superiores a 0,240 nm. Os 45% restantes são referentes às cepas cujas médias de D.O foram inferiores a 0,120 nm, sendo assim, classificadas como não aderentes.

A diferença dos resultados obtidos quando comparamos as duas metodologias (TABELA 1) também foi demonstrada por Mathur et al. (2006) onde verificou-se que o método espectrofotométrico apresentando maior sensibilidade (97,1%) e especificidade (97,5%) quando comparado com o AVC com 6,8% e 90,2%, respectivamente. Podendo assim, caracterizar o primeiro método como um teste quantitativo de sucesso para a detecção de biofilme em *Staphylococcus* spp.

Tabela 1: Relação entre os resultados obtidos pelo Ágar vermelho Congo e pelo método espectrofotométrico

Isolado	Amostra	Espécie	Ágar	
			Vermelho Congo	Espectrofotômetro
01	Cerúmem	<i>S. intermedius</i>	Negra	Fracamente aderente
02	Pele	<i>S. intermedius</i>	Vermelha	Não aderente
03	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente
04	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente
05	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fortemente aderente
06	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente
07	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fracamente aderente
08	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fortemente aderente
09	Pele	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fracamente aderente
10	Secreção mamária	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente
11	Swab otológico	<i>S. pseudintermedius</i>	Vermelha	Fracamente aderente
12	Pele	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente
13	Pele	<i>S. pseudintermedius</i>	Vermelha	Não aderente
14	Pele	<i>S. pseudintermedius</i>	Vermelha	Fortemente aderente
15	Swab otológico	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fortemente aderente
16	Swab otológico	<i>S. pseudintermedius</i>	Vermelha	Fracamente aderente
17	Secreção abdominal	<i>S. pseudintermedius</i>	Vermelha	Não aderente
18	Pele	<i>S. aureus</i>	Negra	Fracamente aderente
19	Pele	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Fracamente aderente
20	Pele	<i>S. aureus</i>	Vermelha	Não aderente

Fonte: elaborado pelo autor

Em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de bovinos e bubalinos, Guimarães et al. (2012) também observou maior sensibilidade do método espectrofotométrico em relação ao AVC. Em trabalho realizado com amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* em cães, Singh et al. (2013) mostrou que 96% dos isolados (n=140) foram capazes de produzir biofilme.

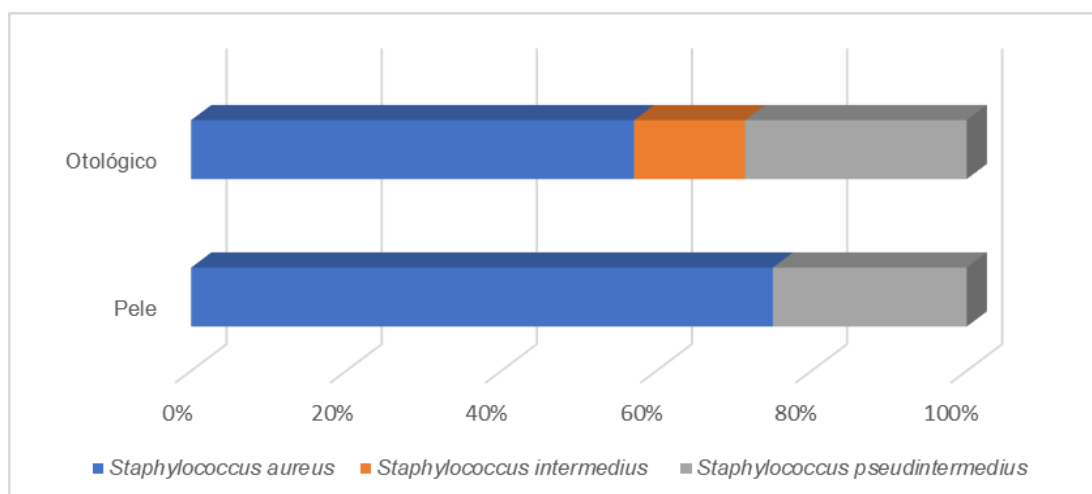
Entretanto, Proietti et al. (2015) notou boa concordância entre os dois métodos. Em seu estudo com *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de piodermite em cães, 93,3% foram produtores de biofilme pelo método

espectrofotométrico, e 86,6% foram positivos pelo AVC. Ribeiro (2017), com amostras de urina de cães com cistite, avaliou que dentre os oito isolados de *Staphylococcus* spp., sete apresentaram produção de biofilme pelo AVC, enquanto seis foram positivos pelo método espectrofotométrico.

Foram encontradas cepas positivas em isolados de pele e ouvido, sendo 4 (36,3%) e 7 (63,7%), respectivamente. *Staphylococcus aureus* foi a espécie que apresentou predomínio em ambos os sítios anatômicos, sendo que, quanto ao primeiro, 75% foram produtores de biofilme, seguido por *Staphylococcus pseudintermedius* com 25%. Sobre as amostras otológicas positivas, 57,1% dos produtores foi de *Staphylococcus aureus*, 28,6% de *Staphylococcus pseudintermedius* e 14,3% de *Staphylococcus intermedius* (FIGURA 2).

Biofilmes bacterianos estão relacionados à diversas doenças em humanos e animais, sendo que geralmente apresentam dificuldade para tratamento. Em humanos casos de otite, endocardite e fibrose cística podem ser citados (CLUTTERBUCK, et al., 2007). Infecções em feridas, pneumonia e mastite são exemplos de patologias presentes em animais (OLSON, et al., 2002).

Figura 2: Relação entre os sítios anatômicos de cães e as espécies produtoras de biofilme



Fonte: elaborado pelo autor

Swanson et al. (2014), descreveu o tratamento de feridas crônicas associada a biofilmes localizadas em ambos os cotovelos em uma cadela de 4 anos de idade. O animal apresentava um leucograma inflamatório, incluindo leucocitose, neutrofilia com desvio a esquerda, e linfopenia. Antimicrobianos orais eram administrados, porém não demonstravam resposta, além disso, também apresentava sinais de sepse, podendo ser associada à dispersão das células bacterianas presentes no biofilme. A cultura microbiana indicou presença de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus* sp. O tratamento incluiu retirada dos tecidos afetados e administração de antimicrobianos.

4 CONCLUSÃO

Os biofilmes apresentam grande relevância quando associados em infecções. Com os resultados obtidos, evidencia-se a capacidade de produção de biofilme por bactérias do gênero *Staphylococcus* em cães. Dentre os isolados, foram encontrados *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, notando-se predomínio do primeiro. O método espectrofotométrico detectou produção de biofilme em 55% dos isolados, enquanto a semeadura em ágar vermelho Congo em apenas 10%. Dessa forma, a análise foi melhor desempenhada pelo método espectrofotométrico, podendo ser considerado uma técnica de sucesso para a avaliação de produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. As cepas positivas foram isoladas de ouvido e pele, sítios anatômicos que apresentam grande relevância quando se trata de infecções em cães. Portanto, a detecção de biofilme em infecções presentes em cães auxilia na terapia e correta aplicação aos antimicrobianos de forma a atingir especificamente o biofilme, não apenas bactérias em sua forma planctônica. Por isso, é indicado maiores estudos acerca da formação e atuação dos biofilmes em Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. R. D. **Isolamento de *Staphylococcus* spp. Multirresistentes da pele de cães saudáveis e com piodermite.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 57-66, 2007.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318 – 326, 1985.

CLUTTERBUCK, A. L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 1-17, 2007.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 8, p. 872 – 874, 1989.

GUIMARÃES, G. et al. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1219-1224, 2012.

HOEKSTRA, K. A.; PAULTON, R. J. L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 406-413, 2002.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, 2013.

LILENBAUM, W. et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 42 – 45, 2000.

LIMA, L. F. A. et al. Antimicrobial resistance in staphylococci isolated from canine pyoderma. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 3, p. 181-185, 2012.

MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-29, 2006.

OLIVEIRA, A.; CUNHA, M. L. R. S. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. 572-596, 2008.

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

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinar Research**, v. 66, p. 86-92, 2002.

PENNA, B. D. A. **Distribuição de espécies e prevalência de resistência à meticilina em amostras de *Staphylococcus* sp.** isoladas de cães. 2013. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

PERCIVAL, S. L.; MCCARTY, S. M.; LIPSKY, B. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. **Advances in wound care**, v. 4, n. 7, 2015.

PROIETTI, P. G. et al. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 8, p. 945-951, 2015.

RIBEIRO, R. A. C. **Avaliação da formação de biofilme por bactérias isoladas de amostras de urina de cães com cistite.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SANTOS, A. L. D. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez, 2007.

SINGH, A. et al. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 93, 2013.

SMELTZER, M. S.; BEENKEN, K. E. *Staphylococcus*. In: MACVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 26.

SWANSON, E. A. et al. Biofilm-infected wounds in a dog. **American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 6, 2014.

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

TUNON, G. I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 58, p. 4 – 7, 2008.

WERCKENTHIN, C. et al. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**, v. 32, p. 341-362, 2001.