Ciência Animal Brasileira
Brazilian Animal Science

DOI: 10.1590/1809-6891v27e-84057P

e-ISSN 1809-6891
Medicina veterinária | Artigo científico

Pontos críticos de contaminação microbiológica na ordenha de búfalas e caracterização de *Staphylococcus* spp.

[Critical points of microbiological contamination in buffalo milking and characterization of *Staphylococcus* spp.]

Gabriela Doncato Duarte[1], Andréia Monique Lermen[1], Amanda de Souza da Motta*[1]

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

*autor correspondente: amanda.motta@ufrgs.br

Recebido: 28 de setembro de 2025. Aceito: 06 de abril de 2026. Publicado: 07 de maio de 2026.
Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A ordenha é uma etapa crítica na produção leiteira, sendo determinante à qualidade microbiológica do leite. Portanto, objetivou-se avaliar aspectos higiênico-sanitários da ordenha de búfalas através da pesquisa microbiológica, com foco no estudo de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Foram realizadas duas coletas de leite de búfala na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), analisadas quanto aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Amostras de superfícies da ordenha foram analisadas por Contagem Padrão em Placa (CPP) e identificadas por MALDI-TOF. Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram caracterizados quanto à coagulase, resistência antimicrobiana, atividade hemolítica, produção de biofilme e de exopolissacarídeos (EPS). O leite cru apresentou CPP acima do permitido pela legislação na Coleta 2, e teores de gordura e proteína inferiores à literatura em ambas as coletas. A CPP nas superfícies da ordenha variou de 2,2 x 10^2 a 1,0^5 x 105 UFC/mL, predominando no interior das teteiras. Entre os microrganismos isolados, *Staphylococcus* foi o mais frequente (32,6 %), seguido de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (12,2 % cada). As espécies identificadas de *Staphylococcus* foram *S. chromogenes, S. hyicus* e *S. capitis*. Somente *S. chromogenes* (6,25 %) apresentou coagulase positiva. *S. capitis* foi resistente a seis antimicrobianos, enquanto os demais foram sensíveis ou intermediários. Nenhum isolado apresentou hemólise ou produção de EPS, enquanto todos isolados foram identificados como formadores de biofilme. Os achados indicam o potencial patogênico dos isolados e a necessidade de monitoramento contínuo e controle rigoroso da ordenha para assegurar a qualidade do leite bubalino e prevenir a disseminação de patógenos e resistência antimicrobiana na cadeia produtiva.

Palavras-chave: Antibiograma; formação de biofilme; leite bubalino; monitoramento; *Staphylococcus* sp.

Abstract: Milking is a critical step in dairy production, being decisive for the microbiological quality of milk. Therefore, this study aimed to evaluate hygienic-sanitary aspects of buffalo milking through microbiological analysis, focusing on the study of bacteria of the genus *Staphylococcus*. Two buffalo milk samplings were carried out at the Estação Experimental Agronômica (EEA) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), which were analyzed for microbiological and physicochemical parameters. Samples from milking surfaces were analyzed by Standard Plate Count (SPC) and

Copyright ©. Este é um artigo em acesso aberto distribuído nos termos da Creative Commons Attribution License que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.

identified by MALDI-TOF. *Staphylococcus* spp. isolates were characterized for coagulase production, antimicrobial resistance, hemolytic activity, biofilm formation, and exopolysaccharide (EPS) production. Raw milk showed SPC levels above the limits established by legislation in Sampling 2, and fat and protein contents lower than values reported in the literature in both samplings. SPC on milking surfaces ranged from 2.2 × 10^2 to 1.05 × 10^5 CFU/mL, with the highest counts found inside teat cup liners. Among the isolated microorganisms, *Staphylococcus* was the most frequent (32.6 %), followed by *Pseudomonas* and *Acinetobacter* (12.2 % each). The *Staphylococcus* species identified were *S. chromogenes, S. hyicus,* and *S. capitis*. Only *S. chromogenes* (6.25 %) showed coagulase activity. *S. capitis* was resistant to six antimicrobials, while the other isolates were sensitive or intermediate. None of the isolates showed hemolysis or EPS production, whereas all isolates were identified as biofilm producers. The findings highlight the pathogenic potential of the isolates and reinforce the need for continuous monitoring and strict control of milking practices to ensure buffalo milk quality and to prevent the dissemination of pathogens and antimicrobial resistance within the production chain.

Keywords: Antibiogram; biofilm formation; Buffalo milk; monitoring; *Staphylococcus* sp.

1. Introdução

O leite bubalino é o segundo mais produzido no mundo, representando 15 % de toda a produção mundial e ficando atrás apenas do leite bovino [1], apesar disso, apenas 7 % do leite consumido no mundo é de origem bubalina. Durante o processo de ordenha e imediatamente após a sua extração do úbere, o leite pode ser contaminado por diversos microrganismos presentes no ambiente [2].

Nesse contexto, as condições higiênico-sanitárias adotadas durante a produção, especialmente no manejo dos animais, na higienização dos equipamentos e na ordenha, são essenciais para assegurar a qualidade do leite. A adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) na pecuária leiteira consiste na aplicação de procedimentos técnicos e operacionais que abrangem todas as etapas da produção nas propriedades rurais, com o objetivo de assegurar a obtenção de leite e derivados seguros, de qualidade e adequados para o consumo, em conformidade com os padrões exigidos [3]. Além das práticas relacionadas ao manejo dos animais, é essencial que o ordenhador adote medidas rigorosas de higiene pessoal, uma vez que atua em contato direto com os tetos, os utensílios e o leite [4].

Dentre os principais microrganismos de interesse em pecuária leiteira, destacam-se os do gênero *Staphylococcus* que podem afetar parâmetros como a composição e a Contagem de Células Somáticas (CCS) [5-6]. Dentre esses, a espécie *S. aureus* é um organismo patógeno oportunista, reconhecido pelo seu potencial de transmissão mútua humano-animal. É uma das principais causas de infecção e doença em uma infinidade de hospedeiros animais, levando a um impacto significativo na saúde pública e na agricultura [7]. No contexto da produção pecuária, destaca-se como um dos principais agentes etiológicos da mastite - enfermidade caracterizada como uma inflamação da glândula mamária [8] e que acarreta significativas perdas econômicas na cadeia leiteira. Por esse motivo, a mastite figura como uma das infecções por *S. aureus* mais frequentemente relatadas em animais [7]. Nesse contexto, espécies do gênero *Staphylococcus* apresentam relevância na interface entre saúde animal, humana e ambiental, sendo frequentemente discutidas sob a perspectiva da Saúde Única (One Health), especialmente devido ao seu potencial zoonótico e à disseminação de resistência antimicrobiana [9].

Além disso, destaca-se *S. chromogenes*, que tem sido reportado como espécie mais prevalente de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) associado à mastite em gado leiteiro em vários estudos [10-12], inclusive em rebanhos bubalinos. Outra espécie importante de SCN é o *S. capitis*, que apresenta capacidade de formar biofilme e resistência a antimicrobianos, além de atuar como agente oportunista em casos de contaminação durante a ordenha, também pode estar associado a casos de mastite em ruminantes [13]. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos higiênico-sanitários do processo de ordenha de búfalas por meio da pesquisa microbiológica de diferentes pontos do processo, com foco no estudo de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

2. Material e métodos

O presente estudo possui caráter exploratório e foi conduzido como um estudo piloto com base em dados preliminares provenientes de um número limitado de coletas. Estudos dessa natureza têm como finalidade gerar informações iniciais, identificar tendências e subsidiar o delineamento de investigações futuras mais robustas [14].

2.1 Local de realização e procedimentos de ordenha

O leite utilizado nesta pesquisa foi coletado no Tambo da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizada no KM 146 da BR 290, no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (latitude sul 30º05’32”, longitude oeste 51º40’37”). Estudou-se um rebanho composto por 42 animais da raça Murrah e Mediterrânea, com 12 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) multíparas, com peso médio de 603 kg ± 44,3 kg e idade entre 4 e 11 anos e média de 173 dias de lactação. A ordenha foi realizada três vezes por semana, através da ordenha mecânica do tipo balde ao pé, com dois conjuntos de teteiras. As ordenhas foram conduzidas conforme os protocolos estabelecidos pelo Guia de Boas Práticas na Pecuária de Leite [3] e pelo Manual de Boas Práticas Agropecuárias na Ordenha: Bubalinocultura [4]. Para tal, antes da ordenha foi realizado o *pré-dipping* com iodopovidona diluído em água na concentração 1:3 (Globo Vac), seguido do teste da caneca de fundo preto e o *California Mastitis Test* (CMT) com o reagente Violeta de Bromocresol (2 mL de reagente para 2 mL de leite) (Tadabras). Após a ordenha foi realizado o *pós-dipping* com iodopovidona pura (Globo Vac). O processo de higienização do Tambo foi realizado pelos colaboradores, sendo conduzido antes de cada sessão de ordenha com uso do Hipoclorito de Sódio (Polibom) e após cada sessão com detergente clorado (Quimiprol). A remoção de material orgânico, para assegurar a sanitização de todos os equipamentos e utensílios utilizados no processo da ordenha, foi sempre realizada. Por envolver manejo de animais, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sendo aprovado sob o número 43289.

2.2 Análises microbiológicas e composição centesimal do leite de búfala

As amostras de leite de conjunto foram coletadas de forma asséptica do tanque de refrigeração logo após o término da ordenha para avaliação da composição centesimal e Contagem Padrão em Placa (CPP). As amostras foram filtradas e homogeneizadas, e posteriormente foram armazenadas em caixas isotérmicas e enviadas para o Laboratório de Microbiologia e Saúde Única do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS - UFRGS). Para análise microbiológica foi realizada a CPP em Plate Count Agar (PCA), de acordo com a metodologia ISO 4833-2 2013 [15] e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). A determinação da composição centesimal das amostras de leite foi obtida por meio de um analisador de leite calibrado para leite de búfala (Akso Master Pro Touch).

2.3 Coleta de suabes de pontos de controle da ordenha para contagem e isolamento de microrganismos

Foram realizadas duas coletas (C1 e C2) de superfícies de diferentes pontos da ordenha com o auxílio de suabes que foram depositados em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1 %. As coletas foram realizadas com 30 dias de diferença. Os pontos de coleta foram escolhidos com base no maior risco à contaminação microbiana do leite, a partir de sua coleta. Sendo eles: Interior da Teteira A e B (ITa e ITb), Tela do Coador (TC), Interior do Resfriador (IR) e Teto de quatro búfalas em lactação na ordenha (TZ 09, TZ03, TB25, TB31). Alguns pontos (IR e TC) foram coletados usando um gabarito com área delimitada conhecida (25 cm^2 e 100 cm^2) para determinação do número de colônias por área, sendo os resultados expressos em UFC/cm^2. As amostras foram acondicionadas em uma caixa térmica com gelo e transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Saúde Única do ICBS - UFRGS. Para análise microbiológica foi realizada a CPP em Plate Count Agar (PCA), de acordo com a metodologia ISO 4833-2 2013 [15] e os resultados foram expressos unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado (UFC/cm^2).

2.4 Seleção de microrganismos e identificação por meio do MALDI-TOF

A seleção de microrganismos no meio PCA foi realizada por morfologia colonial através de características fenotípicas diferentes. As culturas selecionadas foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF através da técnica de transferência direta. Essa técnica consistiu na deposição de uma pequena quantidade de amostra da cultura, previamente isolada em placa de Petri, sobre um spot na placa alvo do MALDI-TOF e em seguida, a amostra foi coberta com matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). As análises foram realizadas em MALDI Biotyper 4.0 (Bruker Daltonics, Bremem, Alemanha) e após o espectro da amostra ser obtido, o software MBT RTC (Real Time Classification) identificou a melhor correspondência comparando com os espectros armazenados no banco de dados do equipamento, gerando assim resultados com diferentes escores de confiabilidade. Escores ≥2.000 indicam identificação em nível de espécie, um escore de 1.700 a 1.999 indicam identificação em nível de gênero e um escore <1.700 era interpretada como sem identificação.

2.5 Seleção de *Staphylococcus* spp. e avaliação dos fatores de virulência

Após a identificação dos diferentes gêneros e espécies de microrganismos por MALDI-TOF, foram selecionadas as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. As culturas bacterianas identificadas foram analisadas quanto à capacidade de coagular plasma (Newprov), com incubação a 37 ºC ± 1 ºC, em aerobiose. O teste foi lido em 4, 6 e 24 h, observando-se a presença ou ausência de coagulação. Para avaliar a produção de hemolisina foi realizada a inoculação dos isolados em Blood Agar Base (Himedia®) contendo 5 % de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas a 37 ºC ±1 ºC durante 24 h e após o período de incubação, foram examinadas para β-hemólise (total), α-hemólise (parcial) ou γ-hemólise (ausência) [16].

2.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Foi empregado o método Kirby-Bauer [17], utilizando os antimicrobianos: Penicilina G (10 UI), Eritromicina (15 µg), Cefoxitina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Levofloxacina (5 µg), Amicacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tobramicina (10 µg), Norfloxacina (10 µg), Clindamicina (2 µg) e Rifampicina (5 µg). Foi preparada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondendo a Escala de Mcfarland 0,5 (10^8 UFC/mL) a qual foi semeada em Ágar Mueller-Hinton. Os discos

contendo antimicrobianos foram inseridos e as placas foram incubadas em estufa a 37 ºC ± 1 ºC por 24 h. A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi realizada em mm, classificando o isolado como suscetível ou resistente de acordo com os critérios interpretativos do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade [18].

2.7 Avaliação da produção de biofilmes

Para a produção de biofilmes, foi usado o método descrito por Stepanovic et al.[19]. Os isolados bacterianos de *Staphylococcus* spp. foram previamente cultivados em placas contendo Tryptic Soy Agar (TSA) e incubados em estufa a 37 ºC ± 1 ºC em aerobiose por 24 h. Após o período de incubação, os isolados foram ressuspendidos individualmente, em solução salina 0,85 % e ajustados conforme a escala 0,5 de McFarland. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação (96 poços) de poliestireno de fundo plano. Os poços foram preenchidos com 180 µL de caldo TSB e 20 µL das suspensões bacterianas, individualmente. Para o controle negativo, a primeira coluna da microplaca foi inoculada somente com caldo TSB, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 [20]. As placas de microtitulação foram incubadas à 37 ºC ±1 ºC por 72 h, para permitir a fixação das células e formação de biofilmes, como descrito por Borucki et al.[21]. Após a incubação, os poços foram aspirados e as amostras lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril 0,85 %. A fixação bacteriana ocorreu com auxílio de 200 µL de metanol 99,8 % (PA) durante 20 min. O metanol foi aspirado, as microplacas invertidas e deixadas secar *overnight* à temperatura ambiente. O procedimento de coloração ocorreu com 200 µL de Cristal Violeta a 0,1 % por 15 min, seguido por lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem da placa, as células bacterianas fixadas e coradas no fundo dos poços foram ressuspendidas em 200 µL de etanol 95 % por 30 min e após, se realizou a quantificação dos biofilmes. A densidade óptica (DO) do biofilme bacteriano foi quantificada com o auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. O isolado bacteriano foi classificado como: não formador de biofilme (DO ≤ Doc), fraco formador de biofilme (DOc < DO ≤ 2 x Doc), moderado formador de biofilme (4 x DOc < DO ≤ 4 x Doc) e forte formador de biofilme (4x DOc < DO). Os ensaios foram realizados em duplicata biológica e em octoplicata técnica.

2.8 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para o ensaio de detecção de exopolissacarídeo (EPS) o método descrito por Freeman et al.[22] foi utilizado. Os isolados bacterianos foram estriados em placas contendo o meio Ágar Vermelho Congo (37 g/L de Brain Heart Infusion (BHI), 50 g/L de sacarose, 10 g/L de ágar e 0,8 g de vermelho congo) e incubadas à 37 °C ± 1 ºC por 24 h, para observação de colônias escuras, indicativas da presença da produção do EPS. Como controle positivo, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição centesimal do leite de búfala e análises microbiológicas

O leite de búfala foi analisado quanto a sua composição centesimal (Tabela 1), onde os teores de proteína foram próximos entre as coletas (≈ 3,6 g/100 g), mas inferiores ao relatado por Bailone et al.[23]. O teor de gordura foi maior na C1 (3,60 g/100 g) em comparação à C2 (2,93 g/100 g), ambos inferiores aos valores descritos por outros autores [1-2], e ao mínimo estabelecido na Resolução SAA – 03 [24]. O teor de lactose foi similar em ambas as coletas e acima dos valores descritos por Costa Filho et al.[25].

As densidades observadas neste estudo (1035,99 g/mL e 1036,34 g/mL) foram superiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente para o leite bovino [26-27], bem como aos parâmetros previstos na legislação estadual específica para o leite bubalino [28]. Ainda assim, os valores obtidos são compatíveis com os relatados por outros pesquisadores [1-2], que atribuem essa elevada densidade à estrutura dos glóbulos de gordura do leite de búfala, os quais são maiores do que os encontrados no leite de vaca [28].

Fatores como nutrição, estágio de lactação, qualidade da ordenha e até fatores ambientais podem influenciar a composição centesimal do leite de búfala, variando os teores de gordura, proteínas e sólidos totais. Além disso, a elevada contagem de células somáticas (CCS), que pode ser provocada por mastite, pode alterar a composição do leite, como a gordura, proteína e lactose [28].

Além disso, foi realizada a CPP na C1 e na C2, na qual obteve-se 1,27 x 10^5 UFC/mL e 1,83 x 10^6 UFC/mL, respectivamente. O valor encontrado na C2 está acima do limite máximo permitido pela legislação (3,00 x 10^5 UFC/mL) [26-27], além de estar acima do resultado encontrado por Di Domenico [28], realizado no mesmo Tambo no período entre junho e novembro de 2021. A autora obteve a média da CPP de 3,35 x 10^4 UFC/mL, sendo o valor mais elevado obtido nas coletas de agosto com 1,39 x 10^5 UFC/mL, porém ainda menor do que o resultado obtido na C2 neste estudo [28]. A CPP é habitualmente utilizada como um parâmetro para avaliar a higiene de todo o processo de produção, o que sugere que as BPAs não foram atendidas no momento da ordenha na Coleta 2, visto que o resultado não está dentro do que preconiza a legislação, uma vez que a limpeza inadequada dos equipamentos e utensílios da ordenha podem afetar o número de bactérias no leite.

Dessa forma, os resultados observados evidenciam a importância de sua interpretação à luz da legislação brasileira vigente, especialmente do Decreto nº 9.013/2017 (RIISPOA) [29] e das Instrução Normativa nº 76 e nº 77 de 2018 do MAPA[26-27], que estabelecem critérios para a obtenção e manutenção da qualidade do leite cru refrigerado. Essas normativas reforçam a obrigatoriedade da adoção de práticas adequadas de higiene durante a ordenha, bem como o controle sistemático da qualidade microbiológica do leite. Nesse contexto, a não conformidade observada na Coleta 2 evidencia a necessidade de adequação às exigências legais, especialmente no que se refere à higienização de equipamentos, manejo durante a ordenha e monitoramento da CPP, a fim de garantir a segurança do produto e atender aos padrões estabelecidos para comercialização.

Tabela 1. Resultados da composição centesimal média do leite de búfala em comparação com os parâmetros oficiais da IN n° 76/2018 e SAA – 03/2008.

Parâmetros	Leite de búfala		IN nº 76/2018 (valor mínimo)	SAA - 03/2008 (valor mínimo)
	Coleta 1	Coleta 2		
pH	6,77	6,99	-	6,40 a 6,90
Proteína (g/100 g)	3,66±0,02	3,64±0,00	2,9	-
Gordura (g/100 g)	3,60±0,02	2,93±0,06	3,00	4,5
Lactose (g/100 g)	5,49±0,03	5,47±0,00	4,3	-
SNG (g/100 g)	9,98±0,05	9,94±0,01	8,4	8,57
Sais (g/100 g)	0,82±0,00	0,82±0,00	-	-
Água (g/100 g)	0±0,00	0±0,00	-	-
Densidade (g/mL)	1035,99±0,22	1036,34±0,09	1028 a 1034	1028 a 1034
IC (ºC)	-0,680±0,00	-0,670±0,00	-0,512 a -0,536	-0,520 a -0,570
Temperatura (ºC)	23,17±1,34	23,93±1,72	-	-
Condutividade (mS/cm)	5±0,00	5,17±0,04	-	-

IN: Instrução Normativa; SAA: Secretaria de Agricultura e Abastecimento; SNG: Sólidos não gordurosos; IC: índice crioscópico.

3.2 Contagem Padrão em Placa dos diferentes pontos de controle da ordenha

As amostras dos suabes de diferentes pontos da ordenha foram analisadas quanto a CPP, onde foram encontrados valores entre 4,25 x 10^4 a 8,65 x 10^4 UFC/cm^2 nas teteiras coletadas (Tabela 2). Valores semelhantes foram encontrados nesses pontos por Garcia et al.[30] após a ordenha (4,6 x 10^4 UFC/mL). Entretanto, valores inferiores foram observados no estudo de Santos, Biângulo e Pereira [31], que investigaram a qualidade microbiológica de ordenhadeiras mecânicas. Os pesquisadores analisaram quatro teteiras distintas, antes e após a higienização do equipamento, e verificaram a CPP variando entre 1,70 × 10^1 e 2,60 × 10^2 UFC/mL antes da higienização. Após o procedimento de limpeza, as contagens foram reduzidas para um intervalo entre 0 e 7,00 × 10^1 UFC/mL. Os resultados do estudo revelam a importância da limpeza da ordenhadeira para reduzir a contaminação bacteriana do leite, garantindo sua qualidade, segurança para o consumo e maior valor comercial [31].

Para a análise da CPP no teto dos animais, a coleta foi realizada antes da aplicação do *pré-dipping.* Na superfície dos tetos dos animais foram encontrados valores entre 2,20 x 10^2 e 1,05 x 10^5 UFC/cm^2 (Tabela 2). Valores semelhantes foram encontrados no estudo de Garcia et al.[30], cujos resultados variaram entre 4,0 x 10^3 UFC/cm^2 e 1,3 x 10^5 UFC/cm^2, ao analisarem a diversidade microbiana no teto de vacas. Já no estudo de Matsubara et al.[32], na coleta antes do *pré-dipping* foram encontrados 7,9 x 10^4 UFC/cm^2 e após o *pré-dipping* encontraram 1,0 x 10^4 UFC/cm^2, uma redução de 87,3 %. A prática do *pré-dipping* contribui de forma significativa para a redução da contaminação bacteriana dos tetos [32].

Tabela 2. Resultado da CPP dos microrganismos provenientes das diferentes superfícies analisadas

Pontos de coleta	Coleta 1	Coleta 2
Interior da teteira A (UFC/mL)	8,65 x 10^4	6,95 x 10^4
Interior da teteira B (UFC/mL)	6,35 x 10^4	4,25 x 10^4
Tela do coador (UFC/cm^2)	1,51 x 10^4	4,00 x 10^4
Interior do resfriador (UFC/cm^2)	5,50 x 10^3	7,30 x 10^2
Teto B025 (UFC/cm^2)	1,30 x 10^3	1,70 x 10^3
Teto B031 (UFC/cm^2)	8,40 x 10^3	1,05 x 10^5
Teto Z003 (UFC/cm^2)	5,80 x 10^2	3,00 x 10^3
Teto Z009 (UFC/cm^2)	2,20 x 10^2	1,75 x 10^3

Após analisar a CPP da tela do coador foram encontrados valores entre 1,51 x 10^4 UFC/cm^2 e 4,00 x 10^4 UFC/cm^2. Valores semelhantes foram encontrados por Siebel et al.[33], que encontraram uma média de 2,5 x 10^4 UFC/mL no coador. No presente estudo, não haviam sujidades visíveis no coador, contudo os resultados sugerem que esse utensílio pode atuar como fonte de recontaminação, mesmo quando o leite apresenta boas condições iniciais. Esse risco aumenta se o coador não for trocado com frequência, não for higienizado entre as ordenhas ou reutilizado sem a devida sanitização [5].

Ao analisar a CPP do interior do resfriador, foram encontrados valores entre 7,3 x 10^2 e 5,5 x 10^3 UFC/cm^2. Silva et al.[34] relataram valores superiores alcançando 1,2 x 10^6 UFC/cm^2 na lateral do equipamento. A quantidade de microrganismos presentes no interior do resfriador pode causar o aumento da CPP do leite, reduzir sua vida de prateleira, aumentar o risco de proliferação de psicrotróficos e patógenos no leite, além de comprometer o rendimento e a qualidade de derivados lácteos [34]. Embora não haja um limite numérico específico para a quantidade de

microrganismos na superfície interna do tanque, a IN nº 77/2018 [25] obriga que os equipamentos sejam submetidos a rotinas rigorosas de higienização e controle sanitário, justamente para evitar a multiplicação microbiana no leite armazenado.

3.3 Identificação dos isolados

Dos 49 isolados identificados (100 %), o gênero *Staphylococcus* foi o mais detectado e representou 32,6 % (n=16), sendo encontrado principalmente no teto dos animais (TZ09, TZ03, TB25, TB31) e no interior da teteira (IT) (Tabela 3). Resultados similares foram encontrados no estudo de Lavor et al. [6], que isolou microrganismos do leite de vacas com mastite, onde o gênero mais identificado foi o *Staphylococcus*, representando 31,1 %. Entre os patógenos mais prevalentes associados com mastite em bovinos e bubalinos estão as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., tendo destaque a espécie *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), como é o caso do *S. chromogenes* [10]. Apesar da presença e identificação de isolados do gênero *Staphylococcus,* nenhum animal apresentou reação ao teste *California Mastitis Test* (CMT) ou teste da caneca de fundo preto positivo nos dias de coleta. Contudo, é importante destacar que nem todos os microrganismos isolados estão necessariamente associados a quadros de mastite, sendo muitos deles integrantes da microbiota ambiental ou comensal da pele dos tetos [35]. Neste sentido, a presença de espécies do gênero *Staphylococcus,* especialmente SCN, deve ser interpretada com cautela, uma vez que podem atuar tanto como colonizadores oportunistas quanto como agentes etiológicos de mastite, dependendo das condições do hospedeiro e do manejo adotado.

A espécie *S. chromogenes* correspondeu a 87,5 % (n=14) do total de isolados do gênero, valor superior ao encontrado no estudo de Israel et al. [10], que verificaram 60 % de *S. chromogenes* no teto de 27 vacas. Já as espécies *S. hyicus* e *S. capitis* corresponderam a 6,25 % cada (n=1) do total de isolados do gênero (Tabela 3). De acordo com Andrade-Becerra et al. [36], as três espécies, encontradas neste estudo, são os SCN mais isolados de mastite subclínica e são referidas, por vezes, como estafilococos ambientais. Além disso, Nagase et al.[37] demonstraram que *S. capitis* pode ser encontrado na pele humana, podendo ser uma fonte potencial para a colonização desta espécie no tecido do úbere bubalino, especialmente em situações em que o ordenhador manuseia os tetos ou utensílios de ordenha sem a devida higienização das mãos. Esses resultados evidenciam a circulação de microrganismos entre diferentes componentes do sistema produtivo, em consonância com a abordagem de Saúde Única, caracterizada pela interação entre animais, manipuladores e o ambiente de produção.

O segundo gênero mais isolado foi *Pseudomonas* (n=5), encontrado principalmente no interior do resfriador (IR) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Bogo et al.[38], onde o gênero *Pseudomonas* foi o mais isolado entre as bactérias gram-negativas das amostras de leite de búfala. A presença de isolados do gênero *Pseudomonas* podem ser justificadas devido a variações de temperatura de armazenamento que ocorrem no refrigerador durante a ordenha e/ou ao longo do dia, permitindo o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos [38].

Juntamente com *Pseudomonas*, o gênero *Acinetobacter* também foi o segundo mais identificado (n=5), encontrado na tela do coador (TC) e no interior do resfriador (IR) (Tabela 3). O gênero *Acinetobacter* é um contaminante alimentar comum e já foi isolado de amostras

de leite [44]. Espécies do gênero *Acinetobacter* representam uma preocupação significativa em saúde pública devido à sua rápida capacidade de desenvolver resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos, bem como à sua notável persistência no ambiente [40].

Tabela 3. Isolados, de diferentes pontos da coleta da ordenha de leite de búfala, identificados através do MALDI-TOF.

Ponto de coleta	Microrganismos identificados	Ponto de coleta	Microrganismos identificados
C1 TC1	*Yarrowia lipolytica*	C2 TC7	*Staphylococcus chromogenes*
C1 TC2	*Acinetobacter johnsonii*	C2 IR2	*Lactococcus lactis*
C1 TC3	*Pseudomonas synxantha*	C2 IR3	*Pseudomonas fluorescens*
C1 TC6	*Curtobacterium flaccumfaciens*	C2 IR5	*Buttiauxella noackiae*
C1 IR1	*Acinetobacter guillouiae*	C2 IR6	*Buttiauxella noackiae*
C1 IR2	*Pseudomonas koreensis*	C2 IR7	*Acinetobacter guillouiae*
C1 IR3	*Pseudomonas koreensis*	C2 TZ09-1	*Buttiauxella agrestis*
C1 IR5	*Pseudomonas synxantha*	C2 TZ09-3	*Buttiauxella gaviniae*
C1 ITa-1	*Staphylococcus chromogenes*	C2 TZ09-4	*Arthrobacter protophormiae*
C1 ITa-2	*Staphylococcus chromogenes*	C2 TZ09-7	*Staphylococcus chromogenes*
C1 ITa-3	*Staphylococcus chromogenes*	C2 TZ03-2	*Acinetobacter guillouiae*
C1 ITa-4	*Staphylococcus chromogenes*	C2 TZ03-6	*Lactercia adecarboxylata*
C1 ITb-2	*Enterobacter asburiae*	C2 TZ03-8	*Proteus mirabilis*
C1 TB25-3	*Staphylococcus chromogenes*	C2 ITa-1	*Staphylococcus chromogenes*
C1 TB25-5	*Bacillus thuringiensis*	C2 ITa-2	*Staphylococcus chromogenes*
C1 TB25-6	*Bacillus pumilus*	C2 ITa-3	*Staphylococcus chromogenes*
C1 TB31-1	*Staphylococcus capitis*	C2 ITa-4	*Arthrobacter koreensis*
C1 TB31-4	*Staphylococcus chromogenes*	C2 ITa-5	*Proteus mirabilis*
C1 TB31-5	*Staphylococcus chromogenes*	C2 ITa-7	*Staphylococcus chromogenes*
C2 TC5	*Lactococcus lactis*	C2 ITa-8	*Staphylococcus chromogenes*
C2 TC6	*Acinetobacter guillouiae*	C2 ITb-3	*Staphylococcus hyicus*

C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; TC: Tela do coador; IR: Interior do resfriador; IT: Interior da teteira; TB25, TB31, TZ03, TZ09: Teto das búfalas. Fonte: Elaborada pelas autoras (2025).

3.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus*

Na avaliação quanto a sensibilidade a antimicrobianos, somente o isolado de *S. capitis* apresentou resistência à penicilina, eritromicina, cefoxitina, norfloxacina, rifampicina e clindamicina. Os demais isolados mostraram-se sensíveis ou intermediários aos antimicrobianos testados. Lopes et al. [41] observaram um perfil de resistência distinto, onde 68,2 % dos seus isolados bacterianos do gênero *Staphylococcus* se mostraram resistentes entre um a sete diferentes antibióticos testados. Além disso, 47 % dos isolados de *S. chromogenes* apresentaram resistência à penicilina [41], no entanto, no presente estudo, nenhum isolado da espécie apresentou resistência ao antibiótico, apenas a espécie *S. capitis* foi resistente à penicilina. Todos os isolados de *Staphylococcus* no presente estudo demonstraram perfil de sensibilidade intermediário para ciprofloxacina (CIP) e levofloxacina. Entretanto, resultados distintos foram apresentados por Silva [8] onde, ao isolar espécies de *Staphylococcus* do leite de ovelha, apenas dois dos quinze isolados de *S. chromogenes* apresentaram perfil intermediário de sensibilidade para CIP, enquanto o restante foi sensível ao antibiótico. Ressalta-se que, a presença de resistência antimicrobiana pode estar associada ao uso prévio de antibióticos no manejo dos animais, bem como à pressão seletiva exercida por tratamentos terapêuticos, favorecendo a sobrevivência e disseminação de cepas resistentes no ambiente de produção. Além disso, superfícies e equipamentos de ordenha podem atuar como reservatórios desses microrganismos, contribuindo para sua persistência e disseminação ao longo da cadeia produtiva.

A detecção de resistência antimicrobiana em *S. capitis* é um achado relevante, especialmente diante do crescente desafio global da resistência bacteriana. A presença de resistência a múltiplos antibióticos, como penicilina, eritromicina e cefoxitina, levanta preocupações sobre a eficácia dos tratamentos convencionais e destaca o potencial risco de disseminação desses genes de resistência no ambiente [42]. Nesse contexto, à luz do conceito de Saúde Única, microrganismos resistentes presentes no ambiente de produção leiteira podem circular entre animais, humanos e o meio ambiente, ampliando o risco de disseminação da resistência. Considerando que espécies do gênero *Staphylococcus* podem atuar como patógenos oportunistas em humanos e animais[7], a resistência observada pode comprometer a resposta ao tratamento em infecções futuras, representando um alerta para a saúde pública.

3.5 Avaliação dos fatores de virulência dos *Staphylococcus*

Dos 16 isolados de *Staphylococcus* testados, somente um (6,25 %) apresentou resultado positivo no teste de coagulase. Esse isolado foi identificado como *Staphylococcus chromogenes*, isolado da tela do coador (C2 TC7). Os demais microrganismos apresentaram resultado negativo. Resultados diferentes foram encontrados por Israel et al. [11], onde 36,7 % dos isolados de *S. chromogenes* mostraram habilidade de coagular plasma de coelho no teste de coagulase em tubo. A produção de coagulase é considerada um relevante fator de virulência em determinadas espécies de *Staphylococcus*, uma vez que promove a coagulação da fibrina, formando uma barreira protetora contra mecanismos de defesa do hospedeiro[44]. Estudos recentes indicam que o *S. chromogenes* pode apresentar variação quanto à produção de coagulase, com populações raras, mas específicas, apresentando atividades de coagulação[10,12]. Além disso, os SCN também necessitam de atenção pois são reconhecidos como os principais agentes etiológicos de infecções subclínicas, como a mastite. Diversas espécies de SCN habitam frequentemente os canais do teto e a pele dos tetos de ruminantes domésticos, podendo ser transferidas para a glândula mamária durante o processo de ordenha ou sucção, sem, necessariamente, provocar infecção no parênquima mamário [40].

Ao avaliar a atividade hemolítica, os 16 isolados de *Staphylococcus* (100 %) não apresentaram produção de hemólise (Tabela 4). Resultados similares foram encontrados no estudo de Silva [8], que identificou 15 isolados de *Staphylococcus chromogenes* em amostras de leite de ovelha, todos com perfil γ-hemólise. Esse resultado corrobora a caracterização de *Staphylococcus chromogenes* como uma espécie de SCN não hemolítica [10]. Além disso, no mesmo estudo de Silva [8], ao avaliar os dois isolados de *S. hyicus* encontrados, verificou-se que um apresentou γ-hemólise e outro α-hemólise, resultado similar ao presente estudo, uma vez que o isolado de *S. hyicus* encontrado apresentou γ-hemólise. Embora a espécie *S. capitis* seja geralmente associada à β-hemólise, a ausência de hemólise no isolado identificado como *S. capitis* pode estar relacionada à possibilidade de se tratar da subespécie *ureolyticus*, conhecida por não apresentar atividade hemolítica [13]. No entanto, neste estudo, não foi possível confirmar se o isolado pertence à subespécie *ureolyticus*, sendo necessários estudos futuros para investigar a identificação em nível de subespécie.

Tabela 4. Resultados da atividade hemolítica, produção de biofilme e de EPS pelos *Staphylococcus* isolados de diferentes pontos de coleta da ordenha de leite de búfala.

Pontos de coleta	Isolado	Hemólise	Biofilme	EPS
C1 ITa-1	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C1 ITa-2	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C1 ITa-3	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C1 ITa-4	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C1 TB31-1	*S. capitis*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C1 TB31-4	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C1 TB31-5	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C1 TB25-3	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C2 ITa-1	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C2 ITa-2	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C2 ITa-3	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C2 ITa-7	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C2 ITa-8	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Forte	Negativo
C2 TZ09-7	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C2 TC7	*S. chromogenes*	γ-hemólise	Moderado	Negativo
C2 ITb-3	*S. hyicus*	γ-hemólise	Forte	Negativo

C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; TC: Tela do coador; IT: Interior da teteira; TB25, TB31, TZ03, TZ09: Teto das búfalas.

3.6 Avaliação da produção de biofilmes

Dentre os 16 isolados de *Staphylococcus*, todos (100 %) formaram biofilme (Tabela 4). Mais da metade dos isolados de *S. chromogenes* (n=9, 57,1 %) foram classificados como fortes formadores de biofilme, enquanto os demais *S. chromogenes* (n=7, 42,9 %) foram classificados como moderados formadores de biofilme. Esse resultado difere do estudo de Israel et al.[11], onde 43,3 % dos isolados dessa mesma espécie foram classificados como fracos formadores de biofilme. Além disso, o isolado de *S. hyicus* foi classificado como forte formador de biofilme. No estudo de Israel et al. [11], que investigou a produção de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, foram identificadas 8 amostras de *S. hyicus,* das quais 2 foram classificadas como forte formadoras de biofilme, 1 como moderada e 5 como fracas formadoras. De acordo com Heath et al. [13], o primeiro fator de patogenicidade identificado na espécie *S. capitis* foi sua capacidade de formar biofilme. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com o autor, uma vez que o isolado dessa espécie foi identificado como moderado produtor de biofilme.

A formação de biofilme em *Staphylococcus* é regulada por diversos genes, incluindo os loci ica (Intercellular Adhesion), bap (Biofilm-Associated Protein), agr (Accessory Gene Regulator), sar (Staphylococcal Accessory Regulator), Spa (*Staphylococcus aureus* protein A), FnBPA/B (Fibronectin-binding proteins A and B) e SasG (*Staphylococcus aureus* surface protein G), bem como por DNA extracelular (eDNA), além de outros fatores relacionados à adesão e à resposta ao estresse ambiental [45]. Variações na presença, expressão ou mutações nesses genes podem resultar em perfis distintos de formação de biofilme mesmo dentro da mesma espécie [46]. Além disso, fatores regulatórios e elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou ilhas de patogenicidade, podem conferir vantagens adaptativas específicas às cepas, influenciando sua capacidade de colonização e persistência no ambiente mamário [7].

A formação de biofilmes é reconhecida como um importante fator de virulência, uma vez que dificulta a ação do sistema imunológico do organismo e apresenta maior resistência aos tratamentos antimicrobianos, favorecendo a persistência e a cronicidade das infecções [46]. A presença de isolados de *S. chromogenes* e *S. hyicus* com elevada capacidade de formar biofilme representa um importante desafio no manejo de infecções em animais de produção, além de

desafios no manejo sanitário. Esses resultados sugerem que infecções causadas por essas espécies de *Staphylococcus* podem necessitar de terapias prolongadas ou combinadas, com antimicrobianos de melhor penetração, além do uso racional de antibióticos baseados em testes de suscetibilidade.

Além disso, a elevada capacidade de formação de biofilme observada nos isolados favorece a persistência desses microrganismos em superfícies de ordenha, dificultando sua remoção durante os processos de higienização e contribuindo para a contaminação cruzada [47]. Esse cenário amplia o risco de disseminação ao longo da cadeia produtiva do leite, evidenciando a inter-relação entre ambiente, animais e manipuladores. Portanto, outras medidas necessárias incluem o reforço da higiene em todo o processo de ordenha, além da intensificação das Boas Práticas Agropecuárias.

3.7 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

Ao avaliar a produção de EPS, os 16 isolados de *Staphylococcus* (100 %) não apresentaram formação de colônias escuras, ou seja, não foram produtoras de EPS, sob as condições experimentais estudadas (Tabela 4). O controle positivo utilizado, *S. aureus* ATCC 25923, apresentou a formação de colônias pretas, indicando a produção de EPS.

Apesar da ausência de produção detectável de EPS pelos isolados de *Staphylococcus* analisados neste estudo, verificou-se a presença de biofilme, evidenciando uma dissociação entre esses dois fenômenos sob as condições experimentais adotadas. Essa aparente contradição pode ser explicada pela complexidade da formação de biofilmes em bactérias, especialmente em espécies do gênero *Staphylococcus*. Segundo Nguyen et al. [48], embora o polissacarídeo intercelular adesivo (PIA), um tipo específico de EPS, seja amplamente reconhecido como componente fundamental da matriz do biofilme, existem formas alternativas de formação. Em cepas de *S. aureus ica*-negativas (incluindo algumas MRSA), a adesão celular pode ser mediada por proteínas de superfície como Bap, Spa, FnBPA/B e SasG, bem como por DNA extracelular (eDNA), resultando em biofilmes PIA-independentes [49]. Dessa forma, é possível que os isolados analisados tenham formado biofilmes estruturados sem a produção dos polissacarídeos detectáveis pelo método utilizado.

Adicionalmente, os biofilmes são estruturas complexas e multifatoriais, podendo ser compostos por diferentes componentes da matriz extracelular, como proteínas, ácidos teicóicos, eDNA e até forças hidrofóbicas de adesão entre as células e a superfície [50]. A ausência de detecção de EPS pode estar relacionada não à real ausência dessas substâncias, mas sim à limitação dos métodos fenotípicos empregados, como o uso do ágar vermelho congo, que detecta preferencialmente certos tipos de polissacarídeos, como o PIA ou poli-N acetilglucosamina (PNAG) [50].

Outro fator relevante é que a expressão dos genes relacionados à produção de EPS pode ser altamente regulada por fatores ambientais, incluindo pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, presença de antimicrobianos e condições de estresse [51].

Dessa forma, a ausência de colônias pretas no teste com vermelho congo não exclui a capacidade dos isolados de formar biofilmes. Ao contrário, sugere a necessidade de abordagens complementares, como ensaios genotípicos para os genes do operon *ica* (como *icaA, icaD, icaB, icaC*), bem como de testes adicionais para identificação de outros elementos da matriz extracelular, como proteínas e eDNA.

4. Conclusão

O estudo permitiu avaliar os aspectos higiênico-sanitários da ordenha de búfalas por meio da investigação microbiológica de diferentes pontos do processo, evidenciando a presença de *Staphylococcus* spp. Foram identificadas contagens bacterianas elevadas em superfícies como teteiras e tetos, além de CPP acima do limite legal em uma das coletas de leite, indicando possíveis falhas pontuais na higienização. O gênero *Staphylococcus* foi o mais frequente, com isolados apresentando capacidade de formação de biofilme e, em um caso, resistência a múltiplos antimicrobianos. Os resultados demonstram que existem pontos críticos no processo de ordenha que requerem maior controle sanitário, reforçando a necessidade de monitoramento microbiológico contínuo para garantir a qualidade do leite bubalino.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de disponibilidade de dados

O conjunto completo de dados que suporta os resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

Contribuições do autor

Conceitualização: Duarte, G. D.; Motta, A. S.; Lermen, A. M. Curadoria de dados: Duarte, G. D.; Análise formal: Duarte, G. D. Investigação: Duarte, G. D. Metodologia: Duarte, G. D.; Motta, A. S.; Lermen, A. M. Administração do projeto: Duarte, G. D.; Motta, A. S. Supervisão: Motta, A. S. Visualização: Duarte, G. D. Redação (rascunho original): Duarte, G. D.; Lermen, A. M. Redação (revisão e edição): Duarte, G. D.; Lermen, A. M.; Motta, A. S.

Declaração de uso de IA generativa

Os autores não utilizaram ferramentas ou tecnologias de inteligência artificial generativa na criação ou edição de qualquer parte deste manuscrito.

Referências

1. Godinho FMS, Krug M, Figueiredo RP, Müller A, Jank L, Tomaszewski CA, et al. Microbiological and physicochemical characteristics of buffalo milk used for dairy products in southern Brazil. Journal of Dairy Research [periódico na Internet]. 2020 [citado 2025 Maio 20];87(4):463-468. Disponível em: https://doi.org/10.1017/S002202992000093X

2. Di Domenico VL, Paiva AR, Jank L, Tomaszewski CA, Motta AM. Implementação de um sistema de ordenha e manejo da qualidade do leite bubalino em uma estação experimental no Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Animal Brasileira [periódico na Internet]. 2023 [citado 2025 Maio 20];24. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-75499E

3. Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO); International Dairy Federation (IDF). Guia de boas práticas na pecuária de leite. Roma, 2013. Disponível em: https://www.fao.org/4/ba0027pt/ba0027pt.pdf

4. Di Domenico VL, Motta AS. Manual de boas práticas agropecuárias na ordenha: bubalinocultura. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2022. Disponível em: https://bufalo.com.br/wp-content/uploads/2022/11/Manual-BPA-bubalinos_Protegido-amanda-RS.pdf

5. Gomes JPF, Teixeira RMA, Cappelle ER, Sousa PG. Diagnóstico zootécnico relacionado a qualidade do leite e ao perfil produtivo do município de Rio Pomba, MG. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes [periódico na Internet]. 2021 [citado 2025 Maio 25];76(2):70-82. Disponível em: https://doi.org/10.14295/2238-6416.v76i2.803

6. Lavor UL, Guimarães FF, Salina A, Mioni MSR, Langoni H. Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic *Staphylococcus* strains search from mastitic cow milk samples on small farms properties. Pesquisa Veterinária Brasileira [periódico na Internet]. 2019 [citado 2025 Maio 25];30(9):715-722. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5523

7. Peton V, Le Loir Y. *Staphylococcus* aureus in veterinary medicine. Infection, Genetics and Evolution [periódico na Internet]. 2014 [citado 2025 Maio 18];21:602–615. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011

8. Silva GV. Avaliação das espécies e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* isolados de leite de ovelha. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012 [citado 2025 Maio 18]. Disponível em: https://rima.ufrrj.br/jspui/bitstream/20.500.14407/11041/2/2012%20-%20Gabriela%20Viana%20da%20Silva.pdf

9 Cuni C, Layer-Nicolaou F, Werner G, Witte W. A look at Staphylococci from the One Health perspective. International Journal of Medical Microbiology [Periódico na Internet]. 2024; 314. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2024.151604

10. Israel LFS, Rabello RF, Domingos SCB, Medeiros LS. Produção de biofilme por *Staphylococcus* chromogenes isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [periódico na Internet]. 2018 [citado 2025 Maio 22];70(6):1943-1949. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9866

11. Israel LFS, Rabello RF, Ferreira LB, Peruquetti RC, Medeiros LS. Biofilm production by *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in dairy herds in state of Acre, Brazil and its implications. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [periódico na Internet]. 2022 [citado 2025 Maio 22];74(4):563-575. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-12271

12. Santos DC, Lange CC, Avellar-Costa P, Santos KRN, Brito MAVP, Giambiagi-deMarval M. *Staphylococcus* chromogenes, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. Journal of Clinical Microbiology [periódico na Internet]. 2016 [citado 2025 Maio 26];54(5):1372-1375. Disponível em: https://doi.org/10.1128/jcm.03139-15

13. Heath V, Cloutman-Green E, Watkin S, Karlikowska M, Ready D, Hatcher J, et al. *Staphylococcus* capitis: Review of Its Role in Infections and Outbreaks. Antibiotics [periódico na Internet]. 2023 [citado 2025 Maio 21];12:669. Disponível em: https://doi.org/10.3390/antibiotics12040669

14 Lakatos EM, Marconi MA. Fundamento da metodologia científica. 9 ed. São Paulo: Atlas, 2021; 368p. Português.

15. International Organization For Standardization. ISO 4833-2. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the sourface plating technique. Geneva: ISO, 2013.

16. Brenden R, Janda JM. Detection, quantitation and stability of the beta haemolysin of Aeromonas spp. Journal of Medical Microbiology [periódico na Internet]. 1987 [citado 2025 Maio 25];24(3):247-251. Disponível em: http://doi.org/10.1099/00222615-24-3-247

17. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology [periódico na Internet]. 1996 [citado 2025 Maio 15];45:493-496. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493

18. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Versão 15. Rio de Janeiro, RJ: Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade, 2025 [citado 2025 Maio 21]. Disponível em: https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/

19. Stepanovic S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. Letters in Applied Microbiology [periódico na Internet]. 2004 [citado 2025 Maio 18];38:428-432. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x

20. Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, d'Azevedo PA, et al. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [periódico na Internet]. 2015 [citado 2025 Maio 18];48:617-621. Disponível em: https://doi.org/10.1590/0037-8682-0017-2015

21. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Douglas RC. Variation in biofilm formation among Strains of Listeria monocytogenes. American Society for Microbiology. [periódico na Internet]. 2003 [citado 2025 Maio 18];69(12):7336-7342. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.69.12.7336-7342.2003

22. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative Staphylococci. Journal of Clinical Pathology [periódico na Internet]. 1989 [citado 2025 Maio 20];42(8):872-874. Disponível em: https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872

23. Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar L, Harris M. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (Bubalus bubalis bubalis) in different farms and seasons in Brazil. Ciência Animal Brasileira [periódico na Internet]. 2017 [citado 2025 Maio 21];18:1-12. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-41815

24. São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo. Resolução SAA nº 03 de 10 de janeiro de 2008. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo, 2008.

25. Costa Filho MHB, Lima Júnior DM, Rangel AHN, Silva FJS, Novaes LP, Galvão Júnior JGB, et al. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. Acta Veterinaria Brasilica [periódico na Internet]. 2014 [citado 2025 Maio 25];8(3):201-208. Disponível em: https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.3.4170

26. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Brasília, DF: MAPA, 2018.

27. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Brasília, DF: MAPA, 2018.

28. Di Domenico VL. Monitoramento da qualidade da qualidade do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) produzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS e desenvolvimento do queijo colonial bubalino. 2023. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2023. [citado 2025 Maio 15]. Disponível em: https://sucupira-legado.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=14005394

29. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 (Brasil). Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. [Internet]. Diário Oficial da União. 2017 mar. 29. [citado 2026 Mar 17]. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698

30. Garcia LGC, Ribeiro JG, Orsine JVC. Condições higiênico-sanitárias da rotina de ordenha de leite bovino. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais [periódico na Internet]. 2014 [citado 2025 Maio 26];16(2):163-172. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/277927568_condicoes_higienico-sanitarias_da_rotina_de_ordenha_de_leite_bovino

31. Santos MRL, Biângulo TZ, Pereira LJ. Avaliação microbiológica de sistema de ordenhadeira mecânica. Científic@ [periódico na Internet]. 2023 [citado 2025 Maio 28];10(2):1–8. Disponível em: https://doi.org/10.37951/2358-260X.2023v10i2.6822

32. Matsubara MT, Beloti V, Tamanini R, Fagnani R, Silva LCC, Monteiro AA, et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. Semina: Ciências Agrárias [periódico na Internet]. 2011 286 [citado 2025 Maio 22];32(1):277-. Disponível em: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n1p277

33. Siebel JC, Suzin GO, Daneluz MO, Timm CD, Cereser ND, Gonzalez HL. Avaliação dos pontos de contaminação na ordenha em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2014, Jaboticabal, SP. Anais eletrônicos [...]. Jaboticabal, SP: UNESP, 2014. p. 484-496 [citado 2025 Maio 28]. Disponível em: http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140104

34. Silva LCC, Beloti V, Tamanini R, d'Ovidio L, Mattos MR, Arruda AMCT et al. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. Semina: Ciências Agrárias [periódico na Internet]. 2011 [citado 2025 Maio 30];32(1):267-276. Disponível em: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n1p267

35. De Buck J, Ha V, Naushad S, et al. Non-aureus Staphylococci and bovine udder health: current understanding and knowledge gaps. Frontiers in Veterinary Science [Periódico na Internet]. 2021;8. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658031

36. Andrade-Becerra RJ, Tarazona-Manrique LE, Vargas-Abella JC. Prevalence and effect of intramammary infection due to coagulase negative staphylococcal (CNS) species in somatic cell counts in milk from Holstein dairy cows in Boyacá, Colombia. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia [periódico na Internet]. 2021 [citado 2025 Maio 19];68(2):95-104. Disponível em: https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n2.98024

37. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, et al. Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. Journal of Veterinary Medicine and Animal Science [periódico na Internet]. 2002 [citado 2025 Maio 19];64(3):245-250. Disponível em: https://doi.org/10.1292/jvms.64.245

38. Bogo M, Cruz KL, Revello AG, Frazzon APG, Motta AM. An investigation of proteolytic, lipolytic activity and biofilm formation by psychrotrophic bacteria isolated from buffalo milk. Journal of Buffalo Science [periódico na Internet]. 2017 [citado 2025 Maio 19];6(2):54-60. Disponível em: https://doi.org/10.6000/1927-520X.2017.06.02.2

39. Neubeck M, Baur C, Krewinkel M, Stoeckel M, Kranz B, Stressler T, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. International Journal of Food Microbiology [periódico na Internet]. 2015 [citado 2025 Maio 15];211:57–65. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001

40. Manchanda V, Sanchaita S, Singh NP. Multidrug resistant Acinetobacter. Journal of Global Infectious Diseases [periódico na Internet]. 2010 [citado 2025 Maio 24];2(3):291-304. Disponível em: https://doi.org/10.4103/0974-777X.68538

41. Lopes TS, Fussieger C, Rizzo FA, Silveira S, Lunge VR, Streck AF. Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira [periódico na Internet]. 2022 [citado 2025 Maio 17];42. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6958

42. Goetz C, Sanschagrin L, Jubinville E, Jacques M, Jean J. Biofilm Formation in Dairy: A Food Safety Concern - Recent progress in antibiofilm strategies in the dairy industry. Journal of dairy Science [periódico na Internet]. 2024 [citado 2025 Maio 20];108(8):8157–8175. Disponível em: https://doi.org/10.3168/jds.2024-25554

43. Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus* aureus isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. The Veterinary Journal [periódico na Internet]. 2007 [citado 2025 Maio 25];174:428-431. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.016

44. Batavani RA, Mortaz E, Falahian K, Dawoodi MA. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical bovine mastitis in Urmia, Iran. Small Ruminant Research [periódico na Internet]. 2003 [citado 2025 Maio 16];50:45-50. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00122-6

45. Acosta AC, Costa MM, Pinheiro Junior JW, Mota RA. Fatores de virulência de *Staphylococcus* aureus. Medicina Veterinária [periódico na Internet]. 2017 [citado 2025 Junho 02];11(4). Disponível em: https://doi.org/10.26605/medvet-n4-1955

46. Marques VF, Souza MMS, Mendonça MMS, Alencar TA, Pribul BR, Coelho SMO, et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. Pesquisa Veterinária Brasileira [periódico na Internet]. 2013 [citado 2025 Junho 04];33(2):161-170. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200005

47. Langoni H, Salina A, Oliveira GC, Junqueira NB, Menozzi BD, Joaquim SF. Considerações sobre o tratamento das mastites. Pesquisa Veterinária Brasileira [Periódico na Internet]. 2017;37(11):1261-1269. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100011.

48. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Computational and Structural Biotechnology Journal [periódico na Internet]. 2020 [citado 2025 Junho 05];18:3324–3334. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027

49. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A review of biofilm formation of *Staphylococcus* aureus and its regulation mechanism. Antibiotics [periódico na Internet]. 2022 [citado 2025 Junho 07];12(1):12. Disponível em: https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012

50. Dakheel KH, Rahim RA, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K. Methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus biofilms and their influence on bacterial adhesion and cohesion. BioMed Research International [periódico na Internet]. 2016 [citado 2025 Junho 02];(1). Disponível em: https://doi.org/10.1155/2016/4708425

51. Ballah FM, Islam S, Rana L, Ferdous FB, Ahmed R, Pramanik PK, et al. Phenotypic and genotypic detection of biofilm-forming *Staphylococcus* aureus from different food sources in Bangladesh. Biology [periódico na Internet]. 2022 [citado 2025 Junho 07];11(949). Disponível em: https://doi.org/10.3390/biology11070949