

Produção de biofilme e susceptibilidade *in vitro* a desinfetantes de *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de leite bovino*

Biofilm Production and *In Vitro* Susceptibility to Disinfectants of *Staphylococcus Coagulase Positive* Isolated from Bovine Milk

Aila Fabiane Peixoto¹, Elizabeth Sampaio de Medeiros¹, Rinaldo Aparecido Mota¹, José Wilton Pinheiro Júnior¹, Karla Danielle Almeida Soares¹, Daniel Dias da Silva¹, Thayná Milena Siqueira Silva Souza¹, Tamyres Izarely Barbosa da Silva² & Renato Mesquita Peixoto²

ABSTRACT

Background: Mastitis is one of the diseases that cause damage to dairy cattle, and coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), are its main etiological agents. The production of biofilms gives these microorganisms a physiological advantage, being an important virulence factor, as it confers their resistance to the action of disinfectants used in hygiene procedures. Therefore, the objective of this study was to evaluate the capacity of CPS, isolated from milk samples from cases of bovine subclinical mastitis in the Alagoas dairy basin, biofilm production and its sensitivity to disinfectant agents used before and after dipping.

Materials, Methods & Results: In the Alagoas Milk Basin Region, 10 properties were selected from the municipalities of Batalha, Cacimbinhas, Major Isidoro and Minador do Negrão, which used a mechanical milking system and supplied milk to a dairy under federal inspection. The *California Mastitis Test* (CMT) was performed on 1155 cows. The animals diagnosed with subclinical mastitis were classified as: mild (+); moderate (++) and severe (+++). CMT positive samples were collected from 2+, totaling 891 samples. After cleaning the papillary ostium, 2 to 5 mL of milk was collected from each fourth breast before milking began. Subsequently, 0.5 µL of each sample was streak plated by exhaustion on 5% Sheep Blood Agar and incubated at 37°C, with readings at 24 and 48 h. The macroscopic and microscopic characteristics of the colonies, catalase and coagulase test were evaluated. Biofilm formation was determined by the microplate adhesion test. The efficacy of the sanitizers was evaluated with the active ingredients: lactic acid (2%), allantoin (0.05%), iodine (0.5%), chlorhexidine (2.0%), chlorine (2.5%), at times 15, 30 and 60 seconds. It was observed that 91.2% of the samples were able to form biofilm; Of these, 22.2%, 29.6% and 48.2% were strong, moderate and weak producers, respectively. The sensitivity profile of chlorhexidine isolates was 79.73%, 80.41% and 83.78%; iodine was 59.46%, 65.54% and 66.22% sensitivity over the evaluated time. For allantoin, the isolates presented sensitivity of 22.30%, 27.03% and 37.74%, for lactic acid, 18.92%, 20.95% and 22.30% of the samples were sensitive, and to chlorine, 12.6%, 15.58% and 17.57% of the isolates were sensitive. Moreover, it was observed that the longer the exposure to the disinfectant, the greater the effectiveness of the same.

Discussion: The results are in line with literature data. *Staphylococcus* spp. from milk samples of animals with subclinical mastitis are able to form biofilm, thus being an important virulence factor. The heterogeneity regarding the biofilm production potential of the isolates is due to the different species of *Staphylococcus* spp. that, through distinct mechanisms, triggers a greater or lesser formation of this virulent factor, as well as having their adhesion tested, end up becoming more strongly attached to the plate. Among the disinfectants tested, it was confirmed that chlorhexidine and iodine are more effective than SCP, which tend to have high levels of sensitivity to these disinfectants. However, although chlorhexidine was more sensitive to SCP, its use in the field should be done with caution, as its effectiveness may be reduced in the presence of chlorinated water or excess organic matter. It is concluded that SCP isolates from bovine milk from subclinical mastitis mammary quarters were able to produce biofilms. These isolates were also *in vitro* sensitive to chlorhexidine and iodine, but periodic evaluation of the efficacy of disinfectants used before and after milking is necessary.

Keywords: bacterial adhesion, cattle breeding, subclinical mastitis, virulence.

DOI: 10.22456/1679-9216.97253

Received: 28 June 2019

Accepted: 30 September 2019

Published: 29 October 2019

*Article based on a Thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Masters's Degree. ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil. ²Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brazil. CORRESPONDENCE: E.S. Medeiros [sampaio.elizabeth@gmail.com]. UFRPE. Rua Dom Manuel de Medeiros S/N. CEP 52171-900 Recife, PE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das enfermidades que mais causa prejuízos à produção e industrialização do leite, por reduzir a qualidade e a quantidade do produto [17,19]. *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), são os principais agentes etiológicos da mastite nos rebanhos [20], causando prejuízos aos produtores, à indústria e provocando riscos à saúde pública [22]. Sua virulência depende da produção de exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares, sendo sua habilidade de aderência ao epitélio da glândula mamária associada à produção de biofilmes [11], que confere uma vantagem fisiológica na sua possível atuação como agente etiológico [13].

Em um biofilme os microrganismos são resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como os desinfetantes usados nos procedimentos de higienização [21]. Sendo que um dos grandes responsáveis por conferir esta proteção seria a rede de exopolissacarídeos (EPS), que age como barreira física, impedindo que esses agentes cheguem a seus sítios de ação [2].

Durante o processo de ordenha recomenda-se o uso adequado de agentes desinfetantes, para reduzir a população de microrganismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos [18], e com isso controlar e/ou diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária [10].

Portanto, objetivou-se avaliar a capacidade de SCP, isolados de amostras de leite proveniente de casos de mastite subclínica bovina na Bacia Leiteira do estado de Alagoas, produzirem biofilmes e sua sensibilidade aos agentes desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

O estudo foi desenvolvido na Região da Bacia Leiteira de Alagoas, onde foram selecionadas 10 propriedades dos municípios de Batalha, Cacimbinhas, Major Isidoro e Minador do Negrão, que utilizavam sistema de ordenha mecânica e forneciam leite para um laticínio sob inspeção federal. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e em diferentes estágios de lactação, criados em sistema semi-intensivo.

Amostragem e coleta

Foi realizado o teste California Mastitis Test (CMT) em 1155 vacas. Os animais diagnosticados com mastite subclínica foram classificados em: leve

(+); moderada (++) e severa (+++). Amostras de CMT positivo a partir de duas cruzes (2+) foram coletadas, totalizando 891 amostras. A coleta foi de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council [15].

Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico¹ a 70%, foram utilizados tubos² de ensaio esterilizados para acondicionar amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Os tubos contendo as amostras foram colocados em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e levados ao Laboratório de Inspeção e Saúde Pública da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Para a realização da cultura primária, uma pequena alíquota (0,5 µL) de cada amostra foi plaqueada pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento em Ágar Sangue de Ovino (ASO)³ a 5% e incubados em estufa a 37°C; foram realizadas leituras com 24 e 48 h. As características macroscópicas e microscópicas (morfo-tintóricas) das colônias foram avaliadas utilizando a técnica de *Gram* [4]. Testes de catalase e coagulase foram realizados para a identificação de SCP, utilizando-se como controle positivo na pesquisa a cepa *S. aureus* (ATCC 29213)⁴.

Produção de biofilme

A capacidade de produção de biofilmes *in vitro* foi determinada de acordo com o método citado por Merino *et al.* [14], com pequenas modificações. As estirpes foram cultivadas em *Tryptone Soya Broth* (TSB)⁵ por 24 h a 37°C. Logo após, uma alçada de cada cultivo foi diluída a 1:40 em TSB adicionado de 0,25% de glicose⁶. Cada amostra, já padronizada, foi colocada em microplacas⁷ de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo em “U”, em triplicata, junto com controles, no volume de 200 µL/cavidade. Após o período de incubação (37°C por 24 h), as placas foram lavadas três vezes com água destilada, e deixadas secar a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de cristal violeta⁶ em cada cavidade, e a placa foi incubada por 2-3 min a temperatura ambiente. Após, cada cavidade foi lavada três vezes com água destilada e acrescida de álcool-acetona⁶ (80:20).

As placas coradas com cristal violeta foram submetidas à espectrofotometria para aferir as respectivas absorbâncias de cada cavidade. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Rosys Anthos 2010)⁸ a 620 nm. Poços não inoculados contendo TSB

com glicose serviram como branco e as cepas controles utilizadas foram ATCC 12228⁴ (negativa) e ATCC 25923⁴ (positiva). O controle negativo (OD) foi usado como base para os cálculos para a determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (ODc) conforme recomendações da literatura [25]. Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra: $OD \leq ODc$ = não produtor, $ODc < OD \leq (2 \times ODc)$ = fraco produtor, $(2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc)$ = moderado produtor, $(4 \times ODc) < OD$ = forte produtor.

Teste de susceptibilidade

Para avaliar a ação dos desinfetantes utilizados no pré e pós-*dipping* foram utilizadas os seguintes princípios ativos: ácido láctico⁶ (2%), alantoína⁶ (0,05%), iodo⁶ (0,5%), clorexidine⁶ (2,0%), cloro⁶ (2,5%), sendo as diluições realizadas conforme orientação dos fabricantes. Para a análise foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas de solução salina estéril (5,5 mL) correspondendo ao tubo 1 da escala de McFarland. A suspensão foi constituída pela solução desinfetante (0,8 mL) diluída de acordo com o fabricante e o leite estéril (0,2 mL). Posteriormente, adicionou-se a suspensão bacteriana (1,2 mL) e cronometrou-se os tempos (15, 30 e 60 s) de exposição para então realizar o repique em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI)⁵. A mistura foi incubada a 37°C durante 24 h para observação da turvação do meio, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos. Após a incubação, a suspensão foi repicada em meio sólido (ASO) para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes desinfetantes e tempo de exposição. A ausência do crescimento bacteriano nas placas indicou a eficácia do produto em questão [5].

Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística descritiva determinando as frequências relativas e absolutas dos tratamentos de acordo com metodologia padrão [3].

RESULTADOS

Ao avaliar os 4620 quartos mamários, verificou-se que 0,32% (15/4620) eram afuncionais, 0,89% (41/4620) apresentaram mastite clínica, 74,22% (3429/4620) foram negativos ao teste CMT e 24,57% (1135/4620) apresentaram mastite subclínica. Destes últimos, 21,49% (244/1135) foram classificados como

mastite leve (+), 43,96% (499/1135) moderada (++) e 34,54% (392/1135) severa (+++). Salienta-se que para este estudo foram colhidas apenas amostras de leite dos quartos mamários que apresentaram mastite subclínica moderada e severa, totalizando 891 amostras.

Do total de amostras de leite analisadas após cultivo e identificação microbiológica, foram isolados 251 *Staphylococcus* spp. dos quais 148 foram classificados como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), e esses quando submetidos ao teste de aderência em microplacas, 91,2% (135/148) demonstraram capacidade de formar biofilme.

Ademais, das 135 amostras que apresentaram capacidade de produção de biofilmes, 22,2% (30/135) apresentaram-se como fortes produtoras, enquanto 29,6% (40/135) e 48,2% (65/135) demonstraram formação moderada e fraca, respectivamente.

No teste de eficácia dos desinfetantes frente aos 148 isolados de SCP dos casos de mastite subclínica os melhores resultados foram advindos do clorexidine, seguido pelo iodo. Assim, para os desinfetantes, utilizados no pré e pós-*dipping*, o perfil de susceptibilidade *in vitro* dos SCP frente à clorexidine, nos tempos de 15, 30 e 60 s foram de 79,73% (118/148), 80,41% (119/148) e 83,78% (124/148), respectivamente. Quanto ao iodo, observou-se que os isolados apresentaram 59,46% (88/148), 65,54% (97/148) e 66,22% (98/148) de susceptibilidade, respectivamente. Para a alantoína, os isolados apresentaram 22,30% (33/148), 27,03% (40/148) e 37,74% (56/148) de susceptibilidade nos mesmos tempos. Com relação ao ácido láctico, observou-se que 18,92% (28/148), 20,95% (31/148) e 22,30% (33/148) das amostras foram sensíveis em 15, 30 e 60 segundos. Já com relação ao cloro, observou-se que 12,6% (18/148), 15,58% (23/148) e 17,57% (26/148) dos isolados foram sensíveis nos tempos estudados (Tabela 1).

O iodo apresentou ação desinfetante inferior a clorexidine, sendo o segundo desinfetante com melhores resultados, com uma média de 63,74% de susceptibilidade. A susceptibilidade média de *Staphylococcus* coagulase positiva a alantoína foi de 29,02%, sendo considerada intermediária quando comparada aos perfis de susceptibilidade aos demais desinfetantes avaliados. Enquanto que, a susceptibilidade média de *Staphylococcus* coagulase positiva frente ao ácido láctico, foi de 20,72%. Adicionalmente, os resultados mais baixos de susceptibilidade observados, dentre os

desinfetantes utilizados, foram em relação ao cloro, pois a maioria dos isolados mostrou-se resistente nos diferentes tempos de análise, tendo como média geral 15,25% de susceptibilidade.

DISCUSSÃO

A formação de biofilme é um fator de virulência importante para diversas bactérias, inclusive *Staphylococcus* spp. [8]. E, a patogênese da mastite é atribuída à combinação de diversos fatores celulares e extracelulares, sendo a formação de biofilme um dos principais mecanismos para a infecção bacteriana persistente ou crônica [6].

Desse modo, observa-se que os resultados do presente estudo foram semelhantes a dados relatados em São Paulo, onde foi evidenciado que 98,9% dos isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de casos de mastite subclínica bovina, se aderiram à placa e foram considerados produtores de biofilmes. Assim, como 74,4% de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na Região Sul-Fluminense também tiveram potencial de produção de biofilme [16].

Vale ressaltar que além da habilidade dos *Staphylococcus* produzirem biofilmes ser um dos fatores de virulência para a mastite, também são um problema em relação ao tratamento das infecções, por permitir que os microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos, desinfetantes e da fagocitose pelo sistema imune, o que torna a mastite subclínica persistente [11]. Essa proteção geralmente está associada ao fato que no biofilme os microrganismos estão envolvidos pela matriz de exopolissacarídeos, a qual impede que as substâncias químicas e as células de defesa tenham acesso às células microbianas.

Na presente pesquisa observou-se uma heterogeneidade quando o potencial dos isolados que produziram biofilme, variando de fraco a forte, o que pode estar relacionado às diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. existentes, e que não foram classificadas nesse estudo, mas que são conhecidas como exercendo capacidade de produzir biofilme como já relatado na literatura [16]. Assim, como determinadas estirpes de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) não só formam com maior facilidade biofilme como também ao terem sua aderência testadas acabam por se firmarem mais fortemente à placa de poliestireno.

O teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp., além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos [24]. Este teste cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pelos *Staphylococcus* spp. sendo então possível verificar se as estirpes são boas formadoras de biofilme ou não [12].

No que diz respeito ao teste de susceptibilidade dos desinfetantes, observou-se situação similar aos 93,3% de susceptibilidade ao clorexidine, para *Staphylococcus aureus*, e 72,7% para SCP, em animais com mastite em regiões de Pernambuco [9]. Entretanto, divergiu, de estudo realizado em Alagoas, em que se observou que o clorexidine apresentou resistência de 100% aos SCP, porém apresentou ação desinfetante de 87,5% para *Staphylococcus aureus* e 91,9% para SCN [18].

Desse modo, embora o clorexidine tenha se apresentado como o desinfetante com maior susceptibilidade frente à *Staphylococcus* coagulase positiva, neste estudo, sua utilização a campo deve ser feita com cautela, pois sua eficácia pode ser diminuída na presença de água clorada ou com excesso de matéria orgânica.

Na presente pesquisa o iodo se mostrou com resultados inferiores a clorexidine, fato esse descrito em outros trabalhos na literatura [7,18,23]. Entretanto, o iodo, é um dos principais desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*, bem como é o princípio ativo encontrado na maioria das propriedades, em virtude da grande disponibilidade do produto no mercado, a rotina e facilidade de uso e de visualização após a aplicação, e já foi evidenciado que *Staphylococcus aureus* e SCP são 100% susceptíveis ao mesmo [10]. Mas, tanto iodo quanto clorexidine são, em geral, os escolhidos para atuarem contra distintos microrganismos, em virtude do perfil de susceptibilidade de inúmeras estirpes frente a esses desinfetantes, inclusive *Staphylococcus aureus* [9].

O fato da alantoína ter se mostrado com susceptibilidade intermediária pode ser atribuída por ser um composto que começou a ser utilizado recentemente, nos processos de higienização na ordenha. Mas salienta-se que há a necessidade da realização de mais estudos como este para avaliar efetivamente a eficácia do mesmo, uma vez que são escassas pesquisas avaliando a susceptibilidade de microrganismos causadores de mastite frente a esse princípio ativo.

Tabela 1. Porcentual de susceptibilidade *in vitro* dos *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) isolados de leite bovino da bacia leiteira de Alagoas a distintos desinfetantes de uso na higienização durante o pré e pós *dipping*.

Desinfetante	Tempo de Exposição (segundos)			Porcentual Médio de Eficácia (%)
	15'	30'	60'	
Alantoína	22,30% (33/148)	27,03% (40/148)	37,74% (56/148)	29,02
Ácido Lático	18,92% (28/148)	20,95% (31/148)	22,30% (33/148)	20,72
Clorexidine	79,73% (118/148)	80,41% (119/148)	83,78% (124/148)	81,30
Cloro	12,60% (18/148)	15,58% (23/148)	17,57% (26/148)	15,25
Iodo	59,46% (88/148),	65,54% (97/148)	66,22% (98/148)	63,74

No que diz respeito ao ácido lático, o perfil de susceptibilidade do mesmo frente ao SCP, foi bem inferior aos 100% evidenciado em Pernambuco [10]. Já o cloro dentre os desinfetantes aqui testados foi o que apresentou sendo o menos eficaz, porém já foi descrito que isolados de SCP podem ser de 40 a 100% resistente a esse desinfetante [10,18].

O uso do cloro como agente desinfetante é prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo, entretanto, tem como desvantagem sua menor estabilidade, além da não observação das recomendações e critérios de uso pelos produtores [1], assim desaconselha-se a utilização deste princípio ativo nas práticas de pré e pós *dipping*, principalmente em virtude da resistência de isolados de SCP ao mesmo.

Percebe-se que a eficácia dos produtos avaliados varia muito entre os estudos, esse fato se deve não somente as espécies de microrganismos, mas também a sua possível resistência aos princípios ativos dos produtos. Este fato ressalta a importância e necessidade de se avaliar constantemente a susceptibilidade dos produtos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras.

Adicionalmente, com os resultados deste estudo, observa-se que a ação da clorexidine, iodo, alantoína, ácido lático e cloro, se intensificou quanto maior foi o tempo de exposição, demonstrando que a concentração e o tempo de contato são fatores que podem interferir na ação do desinfetante, assim deve-se respeitar o tempo mínimo de ação recomendado para os desinfetantes utilizados no pré e pós *dipping*.

Portanto, como o processo de infecção da glândula mamária, por microrganismos de origem contagiosa, tais como espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, ocorre via ascendente pelo canal do teto e, tendo em vista, o potencial dos mesmos de adesão e formação de biofilmes nos alvéolos, tornando-se fontes

constante de infecção e contaminação, evidencia-se a importância da realização da correta antisepsia dos tetos, por meio da utilização do pré e pós *dipping* na prevenção e controle da mastite [12]. Além disso, é necessária a avaliação periódica dos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras, pois existem variações no perfil de susceptibilidade e resistência que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina [10].

CONCLUSÃO

Isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo do leite bovino provenientes de quartos mamários com mastite subclínica foram capazes de produzir biofilmes. Entretanto, *in vitro* se mostraram susceptíveis à clorexidine e ao iodo, os quais tiveram sua eficácia otimizada quando maior era o tempo de exposição. Contudo se faz necessária a avaliação periódica da eficácia dos desinfetantes utilizados antes e após a ordenha.

MANUFACTURERS

¹Start Química. Uberlândia, MG, Brazil.

²ThermoFisher Scientific. Waltham, MA, USA.

³Laborclin. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Recife, PE, Brazil.

⁵Difco Laboratories. Sparks, MD, USA.

⁶Sigma-Aldrich. Saint Louis, MO, USA.

⁷Greine Bio-One. Americana, SP, Brazil.

⁸Anthos Labtec Instruments. Salzburg, Austria.

Funding. The work was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ethical approval. This work is part of the Dissertation of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Universidade Federal Rural de Pernambuco under number 037/2018.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Amaral L.A., Romano A.P.M., Nader filho A. & Rossi Junior O.D. 2004.** Avaliação da eficiência da desinfecção de teteadas e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24(4): 173-177.
- 2 **Boari C.A., Alves M.P., Tebaldi V.M.R., Savian T.V. & Piccoli R.H. 2009.** Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29(4): 886-895.
- 3 **Bussab W.O. & Marettin P.A. 2004.** *Estatística Básica*. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 120p.
- 4 **Carter G.R. 1988.** *Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 250p.
- 5 **Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Garino Junior F., Silva J.A.B. & Thiers S.F.O. 1998.** Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós-ordenha (*teat dipping*) para controle da mastite bovina. *Revista Napgama*. 1(1): 18-22.
- 6 **Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. 1999.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 284 (5418): 1318-1322.
- 7 **Coutinho L.C.A., Medeiros E.S., Silveira N.S.S., Silva L.B.G. & Mota R.A. 2012.** Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32 (1): 61-65.
- 8 **Jain A. & Agarwal A. 2009.** Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods*. 76: 88-92.
- 9 **Lopes L., Lacerda M. & Ronda J. 2013.** Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 21(1): 1-9.
- 10 **Medeiros E.S., Santos, M.V., Pinheiro Júnior J.W., Faria E.B., Wanderley G.G., Teles J.A.A. & Mota R.A. 2009.** Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(1): 71-75.
- 11 **Melo P.C. 2008.** Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina. 2008. 122f. Jaboticabal, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- 12 **Melo P.C., Ferreira L.M., Nader-Filho A., Zafalon L.F. & Vicente H.I.G. 2012.** Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*. 28(1): 94-99.
- 13 **Melo P.C., Ferreira L.M., Nader Filho A., Zafalon L.F., Vicente H.I.G. & Souza V. 2013.** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(1): 119-124.
- 14 **Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J.A., Foster T.J., Penadés J.R. & Lasa I. 2009.** Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 191(3): 832-843.
- 15 **National Mastitis Council (NMC). 2004.** Recommended protocols for evaluating efficacy of postmilking teat germicides. *The 46th Annual Meeting Proceedings* (San Antonio, USA). pp.179-399.
- 16 **Noel C.C., Motta F.S., Francisco N.L.F.S., Almeida N.R. & Soares L.C. 2016.** Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus* spp. Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. *Revista de Saúde*. 7(1): 22-26.
- 17 **Quadros D.G., Andrade A.P., Silva G.A.V. & Kanematsu C.H. 2019.** Maior nível tecnológico e escala de produção propiciam melhor qualidade do leite e menor ocorrência de mastite bovina? *Revista Acadêmica de Ciência Animal*. 17: e17003.
- 18 **Ramalho A.C., Soares K.D.A., Silva D.F., Barros M.R.C., José W., Pinheiro Júnior J.W., Oliveira J.M.B., Mota R.A. & Medeiros E.S. 2012.** Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(12): 1285-1288.
- 19 **Saeki E.K., Peixoto E.C.T.M., Matsumoto L.S., Marcusso P.F. & Monteiro R.M. 2011.** Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Veterinaria Brasílica*. 5(3): 284-290.
- 20 **Santana E.H.W., Beloti V., Aragon-alegro L.C. & Mendonça M.B.O.C. 2010.** Estafilococos em Alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77(3): 545-554.

- 21 **Santos S.S. 2009.** Investigação da presença e da formação de Biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite. 2009. 76f. Jaboticabal, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- 22 **Santos L.L., Pedroso T.F.F. & Guirro E. 2010.** Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. *Ciência Animal Brasileira*. 11(4): 860-866.
- 23 **Santos I.C., Silva D.R., Oliveira A.F., Oliveira V.R. & Martins L.A. 2018.** Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados no pré-dipping frente a amostras de *Staphylococcus* spp. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*. 3(1): 1-4.
- 24 **Stepanovic S., Vukovic D., Davic I., Savic B. & Vlahovic M.S. 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40(2):175-179.
- 25 **Stepanovic S., Cirkovic I., Mijac V. & Svabic-Vlahovic M. 2003.** Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. 20(3): 339-343.
- 26 **Yamazi A.K., Moraes P.M., Viçosa G.N., Ortolani M.B.T. & Nero L.A. 2010.** Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Bioscience Journal*. 26(4): 610- 618.