



CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DE DESINFETANTES COMERCIAIS FRENTE A STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE MASTITE EM CAPRINOS E DETECÇÃO DO GENE *icaD*

*MINIMUM BACTERICIDAL CONCENTRATION OF COMMERCIAL DISINFECTANT AGAINST STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLATED FROM MASTITIS FROM GOATS AND DETECTION OF *icaD* GENE*

Wellington Erasmo de Lima e Silva¹ ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-9159-3168>

Evandro Santos Amanso² ORCID - <http://orcid.org/0000-0001-7665-8528>

Rodolfo de Moraes Peixoto^{3*} ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-5757-5935>

João José de Simoni Gouveia² ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-0438-094X>

Gisele Veneroni Gouveia² ORCID - <http://orcid.org/0000-0003-1074-5711>

Mateus Matiuzzi da Costa² ORCID - <http://orcid.org/0000-0002-9884-2112>

¹Faculdade de Ciências Agrárias de Araripina, Araripina, PE, Brasil

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.

³Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina, PE, Brasil.

*Correspondent author - rodolfo.peixoto@ifsertao-pe.edu.br

Resumo

O presente trabalho objetivou avaliar a eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais frente a *Staphylococcus* spp. em isolados de casos de mastite em cabras e relacionar a resistência observada com a presença do gene *icaD*. A microdiluição em caldo foi utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos desinfetantes e a técnica de vermelho congo para a avaliação da produção de biofilme e amplificação do gene *icaD*. Todas as amostras avaliadas foram sensíveis aos desinfetantes, com as seguintes faixas de atividade: amônia quaternária (0,13 – 21,33 µg/ml), clorexidina (4,00 – 313,00 µg/ml) e iodo (190,00 – 12500,00 µg/ml). No entanto, o desinfetante a base de hipoclorito de sódio não apresentou atividade bactericida na faixa de concentração 15,0 a 0,03 µg/ml. O gene *icaD* apresentou frequência de 14,7% nos isolados. O teste exato de Fisher apontou efeito significativo da relação entre o valor da concentração bactericida mínima do desinfetante à base de amônia quaternária e a presença/ausência do gene *icaD* (P<0,01). Os desinfetantes comerciais com os princípios ativos amônia quaternária, clorexidina e iodo, apresentaram atividade *in vitro* até mesmo em concentrações inferiores às preconizadas pelos fabricantes, o que torna necessária a realização periódica da avaliação do perfil de sensibilidade aos desinfetantes.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; biofilme; caprinos leiteiros; ordenha; produtos químicos.

Abstract

This study evaluated the *in vitro* efficacy of commercial disinfectants against *Staphylococcus* spp., isolated from mastitis cases in goats, and associates the resistance observed with the presence of *icaD* gene. Broth microdilution was used to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of disinfectants. To evaluate the biofilm production were used Congo Red technique and *icaD* gene amplification. All the isolates were sensitive to disinfectant, with the following activity ranges: quaternary ammonium (0.13 – 21.33 µg/ml), chlorhexidine (4.00 – 313.00 µg/ml) and iodine (190.00 – 12500.00 µg/ml), however the disinfectant based in sodium hypochlorite showed no activity in the concentration range 15.0 to

0.03 µg/ml. The *icaD* gene presented frequency of 14.7% in the isolated. The Fisher exact test showed significant effect of the relationship between the value of the minimum bactericidal concentration of disinfectant based on quaternary ammonium and the presence / absence of the *icaD* gene ($P < 0.01$). Commercial disinfectants with quaternary ammonium active ingredients, chlorhexidine and iodine showed activity *in vitro* even at lower concentrations than recommended by manufacturers. Therefore, it is necessary to perform periodic evaluation of the sensitivity profile of the disinfectants.

Keywords: antimicrobial activity; biofilm; dairy goat; milking; chemical substances.

Recebido em: 26 de maio de 2018.

Aceito em: 20 de março de 2019.

Introdução

A mastite é uma enfermidade de etiologia complexa, sendo caracterizada por alterações inflamatórias da glândula mamária, por mudanças físicas, químicas e bacteriológicas no leite e modificações no tecido glandular. Essa doença está associada a perdas econômicas na produção de leite, além de ser um importante problema de saúde pública⁽¹⁾.

Os agentes etiológicos comumente envolvidos na mastite dos pequenos ruminantes são bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e as enterobactérias^(2,3). Entre os micro-organismos citados, *Staphylococcus* spp. são identificados com maior frequência nas infecções intramamárias nos pequenos ruminantes. Para Marogna et al.⁽⁴⁾, entre os *Staphylococcus* spp., a espécie *S. aureus* é considerada a mais importante, com frequências variando de 4% a 40% de todos os micro-organismos isolados.

A produção de substâncias extracelulares polissacarídicas naturais, permite a aglomeração das células bacterianas em multicamadas de biofilme, tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos^(5,6). Dentre os genes envolvidos, a coexpressão dos genes *icaA* e *icaD* acarreta um aumento significativo na produção do polissacarídeo envolvido na maturação dos biofilmes⁽⁷⁾.

Diversas medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores da mastite como, por exemplo, a higienização dos tetos, da ordenhadeira mecânica e da mão do ordenhador com antimicrobiano. Essas medidas, além de prevenirem a mastite, têm papel importante na qualidade microbiológica do leite. Dentre os desinfetantes comumente utilizados na higienização e desinfecção do ambiente de ordenha destacam-se os compostos de amônia quaternária, clorexidina, cloro e iodo⁽⁸⁾.

A maioria dos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de desinfetantes é voltada para isolados provenientes de casos de mastite bovina, sendo ainda escassas as pesquisas com isolados provenientes de mastite caprina. O objetivo do presente estudo foi determinar a eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no ambiente de ordenha frente a *Staphylococcus* spp., isolados de cabras com mastite subclínica no estado de Pernambuco.

Material e métodos

Foram avaliados 68 isolados de *Staphylococcus* spp. pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF),

que foram isolados do leite de cabras com mastite subclínica, em propriedades das regiões do Vale do São Francisco e litorânea do estado de Pernambuco (Brasil).

A avaliação fenotípica para produção de biofilme pelos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada através da técnica do Agar Congo Red (CRA). Após a semeadura das amostras no meio de cultura Agar Congo Red e incubação por 24 h a 37 °C, as colônias que apresentaram coloração enegrecida foram descritas como positivas para produção de biofilme⁽⁶⁾.

Para a avaliação do potencial genotípico para formação de biofilme foi realizada a amplificação do gene *icaD*, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando termociclador automático (Amplitherm®). Na amplificação foram utilizados os seguintes iniciadores: (seicaDF) 5'-AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA-3' e (seicaDR) 5'-AGTACAAACAACTCATCCATCCGA-3', conforme metodologia realizada por Vasudevan et al.⁽⁵⁾ e Greco et al.⁽⁶⁾. Como template foi utilizado o DNA termoextraído em água ultrapura dos isolados bacterianos. Dois microlitros do DNA extraído foram acrescidos a 48µl do mix de PCR, contendo 15pmol dos primers, 200µM dos desoxirribonucleotídeos, Tampão de Taq 1x e 5U de Taq DNA Polimerase. A PCR conteve as seguintes condições de reação: 35 ciclos constituídos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos. O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e documentado através de um sistema de fotodocumentação.

A avaliação da atividade dos desinfetantes testados sobre os micro-organismos isolados de leite mastítico foi realizada por meio do método em meio líquido e semeaduras em ágar Mueller–Hinton (MH). A concentração testada dos desinfetantes foram aquelas indicadas pelos fabricantes (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de desinfetantes comerciais utilizados para prevenção de mastite quanto à sua composição e indicações descritas pelo fabricante

Produtos	Composição	Indicação/forma de uso	Faixa de concentração empregada no estudo (µg/ml)
A	Cloreto de alquil dimetil benzil amônio 30 g, polioxietilenonilfenilletter 5 g e veículo q.s.p. 100 ml	Desinfecção de ordenhadeiras mecânicas, úberes e mão do ordenhador. Diluir em água na proporção de 1:2000.	300 a 0,125
B	Digluconato de clorexidina (1%), espessantes, tensoativo não iônico, agentes emolientes e hidratantes	Pré-dipping. Pronto para o uso.	10.000 a 4,0
C	Hidróxido de Sódio, Hipoclorito de Sódio (6%), Tensoativos, Sequestrantes, Inibidores de Corrosão	Máquinas de ordenha, pasteurizadores, circuitos, usinas de leite em geral. Diluir 25 ml do produto em 10 L de água.	15,0 a 0,03
D	PVP-Iodo 5ml (5000 ppm de iodo titulável), Excipientes qsp 100ml	No pré-dipping recomenda-se diluir 1 ml do detergente em 3 ml de água e no pós-dipping já vem pronto para o uso.	50.000 a 20

As amostras foram transferidas de microtubos com Brain Heart Infusion (BHI) glicerinado (70:30) para placas com ágar sangue ovino 5%, com o auxílio de uma alça de platina e incubadas a 37 °C por 24 h. A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos desinfetantes comerciais seguiu as descrições do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2005)⁽⁹⁾. Os desinfetantes comerciais foram diluídos em 200µL de Caldo Mueller Hinton (MH). Utilizou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo correspondendo a 0,5 da escala de Mac Farland. Dessa suspensão, foram inoculados 10µL (1x 10⁴ UFC) em cada microtubo contendo a diluição do desinfetante comercial. O material foi incubado a 37 °C por 24 h, em condições de aerobiose. A partir das diluições da amostra, nas quais não foi verificado crescimento bacteriano visível, foi retirada uma alíquota de 10µL, semeando-a na superfície de ágar MH e incubando-a por 24 h a 37 °C. Na sequência, foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) como a menor concentração do desinfetante comercial em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para os resultados do perfil de sensibilidade *in vitro*, utilizou-se a estatística descritiva, com distribuição dos valores em percentual. A análise de concordância dos resultados dos testes fenotípico e genotípico, relacionados à formação de biofilme, foi realizada pelo cálculo do índice Kappa. Considerou-se como CBM o valor que se repetiu duas vezes na triplicata. O teste de Mann-Whitney foi realizado com o objetivo de comparar os valores da CBM obtidos para entre os isolados biofilme positivo e negativo.

Resultados e discussão

O resultado do perfil de sensibilidade *in vitro* das amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de caprinos com mastite indicou 100% de sensibilidade aos desinfetantes: amônia quaternária (A), clorexidina (B) e iodo (D), quando utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes (Tabela 2). Ao contrário dos outros desinfetantes testados, o desinfetante C (hipoclorito de sódio) mostrou-se ineficaz na concentração indicada pelo fabricante (15 µg/ml). Resultado semelhante foi encontrado por Medeiros et al.⁽⁸⁾ estudando a eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping sobre as amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes de bovinos leiteiros, observaram atividade *in vitro* de 100% do iodo, 93,3% para clorexidina, 80% para amônia quaternária e 100% de resistência ao cloro.

Tabela 2: Sensibilidade de *Staphylococcus* spp. cultivados a partir de amostras de mastite caprina frente a quatro desinfetantes comerciais indicados para o ambiente de ordenha.

Desinfetantes	Princípio Ativo	Atividade observada (%)
A	Amônia	100 (68/68)
B	Clorexidina	100 (68/68)
C	Hipoclorito de Na	0 (0/68)
D	PVP-Iodo	100 (68/68)

Um dos fatores que pode explicar a alta atividade dos desinfetantes comerciais sobre as bactérias causadoras da mastite em cabras é a baixa utilização desses agentes antimicrobianos no ambiente de ordenha em pequenas propriedades do estado de Pernambuco. Questionários aplicados aos produtores de caprinos leiteiros do sertão pernambucano e baiano comprovam a não utilização de desinfetantes antes e após o manejo de ordenha⁽¹⁰⁾. Além disso, as condições controladas do estudo possibilitam uma menor interferência de contaminantes orgânicos, sendo um fator importante para obtenção dos

resultados demonstrados neste estudo.

A ausência de atividade do hipoclorito de sódio perante *Staphylococcus* spp. deve-se, principalmente, à baixa concentração indicada pelo fabricante para o uso em máquinas de ordenha, pasteurizadores, circuitos e usinas de leite em geral. Segundo Fonseca e Santos⁽¹¹⁾, as concentrações de 2% e 4% de hipoclorito de sódio são as mais indicadas no pré e pós-dipping, respectivamente. Alguns estudos realizados nos últimos anos têm observado uma constante ausência de atividade de fontes de cloro como, por exemplo, o hipoclorito de sódio como agente controlador de micro-organismos causadores da mastite^(8, 12). Por outro lado, é relevante o potencial dos produtos à base de cloro na remoção de agregados minerais e do próprio biofilme em equipamentos utilizados na indústria de laticínios.

Quanto ao perfil de sensibilidade de micro-organismos provenientes de rebanhos leiteiros aos desinfetantes, testando as concentrações específicas de fabricantes, são ainda escassos os estudos sobre o tema. Medeiros et al.⁽¹³⁾ ao estudarem os fatores de risco associados à mastite observaram que o manejo inadequado da ordenha, a falta de lavagem dos tetos e a lavagem manual dos equipamentos de ordenha estão associados à positividade de patógenos no exame microbiológico do leite.

Das 68 amostras de *Staphylococcus* spp. avaliadas, 8,8% (n=6) foram identificadas fenotipicamente como produtoras de biofilme, por meio da técnica do Agar Congo Red, sendo que apenas três destes isolados amplificaram o gene *icaD*. Outras sete amostras que se apresentaram fenotipicamente negativas para produção de biofilme a partir da técnica CRA foram caracterizadas genotipicamente como produtoras de biofilme através da amplificação do gene *icaD*, totalizando 14,7% (n=10) das amostras estudadas. A análise de concordância entre os dois testes, relativo ao índice Kappa foi de 0,30, indicando uma fraca relação entre eles.

Uma parte dos isolados avaliados neste estudo apresentou potencial genético para formação de biofilme com possível patogenicidade, porém com resultados negativos no teste fenotípico. Resultado semelhante foi encontrado por Ciftci et al.⁽¹⁵⁾ que estudando a resistência e produção de biofilme por *Staphylococcus* isolados de casos de mastite observaram a falta de correlação entre as técnicas do Agar Congo Red e a PCR para os genes *icaA* e *icaD*. Segundo Gerke et al.⁽¹⁴⁾, a presença do gene *icaD* em *Staphylococcus* leva a uma expressão fenotípica e a um aumento significativo da produção de polissacarídeos capsulares envolvidos com a formação de biofilme. No entanto, outros genes também participam de tal processo e podem ter maior importância na instalação de biofilme desses isolados.

O método fenotípico para detecção de formação de biofilme apresenta maior subjetividade do que o teste genotípico e apresenta algumas variações intrínsecas das técnicas empregadas. A leitura do teste CRA deste estudo foi realizado após 24 h do cultivo em meio Agar Congo Red. Porém, um estudo realizado por Arciola et al.⁽¹⁶⁾, demonstra que existe uma variação quanto ao tempo da leitura após o cultivo entre espécies do gênero *Staphylococcus*.

De acordo com Clutterbuck et al.⁽¹⁷⁾, a organização das células bacterianas através de uma matriz de biopolímeros, biofilme, pode ser desenvolvida por diversos patógenos de interesse veterinário, como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila*. Um estudo realizado por Oliveira et al.⁽¹⁸⁾ indicou que o biofilme produzido por bactérias do gênero *Staphylococcus* em casos de mastite está relacionado à cronicidade da infecção intramamária. Além disso, este trabalho revelou um potencial gênico de 14,7% (n=10) para produção de biofilme em amostras *Staphylococcus* spp. isoladas de caprinos no estado de Pernambuco. No entanto, os resultados sugerem que outros genes podem estar envolvidos no processo de formação do biofilme.

As médias das concentrações bactericidas mínimas dos desinfetantes amônia quaternária e clorexidina ante *Staphylococcus* spp. foram 8,44µg/ml e 41,88 µg/ml, respectivamente. Os valores da CBM do

iodo variaram de 190 µg/ml a 12.500 µg/ml, com média de 5.148 µg/ml (Tabela 3). Não foi possível calcular a CBM do hipoclorito de sódio porque a dose indicada pelo fabricante não apresentou atividade bactericida nas amostras avaliadas.

Tabela 3: Médias da concentração bactericida mínima (µg/ml) de acordo com a presença do gene *icaD* e faixa de atividade dos desinfetantes comerciais frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica em caprinos

Desinfetante	<i>Staphylococcus</i> spp.		Faixa de atividade (µg/ml)
	<i>icaD</i> (-)	<i>icaD</i> (+)	
A (Amônia)	9,49 ^a	2,31 ^b	0,13 – 21,33
B (Clorexidina)	46,22 ^a	16,67 ^a	4,00 – 313,00
D (Iodo)	5053 ^a	5703 ^a	190,00 – 12500,00

* Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Um estudo revelou que os compostos de amônia quaternária apresentam maior eficácia sobre as bactérias gram-positivas. Já o digluconato de clorexidina apresenta atividade *in vitro* diante de bactérias gram-positiva, gram-negativa e fungos⁽¹⁹⁾. Pedrini e Margatho⁽²⁰⁾, estudando a sensibilidade de micro-organismos causadores da mastite contagiosa e ambiental aos desinfetantes, observaram que o iodo a 2% e a 1% apresentou alta atividade *in vitro* sobre os micro-organismos patogênicos isolados de casos de mastite, seguido pela clorexidina.

Apenas a CBM da amônia apresentou relação significativa quanto à presença/ausência do gene *icaD*. Ao contrário do esperado, os isolados de *Staphylococcus* spp. testados contendo o gene *icaD* apresentaram-se mais susceptíveis à amônia quaternária do que as bactérias que não continham o gene *icaD*. Esses dados são contrários aos descritos por Moretro et al.⁽²¹⁾ avaliando a relação entre a presença do gene *icaA* e resistência a compostos quaternários de amônia em *Staphylococcus* spp. isolados na indústria de alimentos. Esse fato pode ser um indicativo de que outros fatores, além do gene *icaD*, possam estar envolvidos na resistência das bactérias aos desinfetantes à base de amônia. Langoni et al.⁽²²⁾ alerta para a importância dos processos de desinfecção no controle das mastites contagiosa e ambiental em caprinos. Na susceptibilidade à clorexidina e ao iodo, o teste não apontou relação entre os valores da CBM e a presença/ausência do gene *icaD* ($P > 0,05$).

Conclusão

Os desinfetantes comerciais com os princípios ativos amônia quaternária, clorexidina e iodo foram os que apresentaram as melhores atividades *in vitro* sobre as amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina. O mesmo não ocorreu com o hipoclorito de sódio. No entanto, os dados obtidos no presente estudo não permitem estabelecer uma relação entre a resistência aos desinfetantes e produção de biofilme nos isolados. Contudo, é fundamental tanto a realização periódica do perfil de sensibilidade aos desinfetantes quanto o conhecimento das características e concentrações de cada produto antes de empregá-los nos programas de controle da mastite e qualidade do leite.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e UNIVASF (Universidade Federal do Vale do São Francisco) pela concessão da bolsa de iniciação científica para

o estudante Welington Erasmo de Lima Silva.

Referências

1. Heikkilä AM, Nousiainen JI, Pyörälä S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95, 139-150.
2. Koop G, De Vlieghe S, De Visscher A, Supré K, Haesebrouck F, Nielen M, Van Werven T. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 2012; 95, 5075–5084.
3. Mishra, AK, Sharma N, Singh DD, Gururaj K, Abhishek, Kumar V, Sharma DK. Prevalence and bacterial etiology of subclinical mastitis in goats reared in organized farms. *Veterinary World*. 2018; 11(1), 20–24.
4. Marogna G, Pilo C, Vidili A, Tola S, Schianchi G, Leori S.G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. *Small Ruminant Research*. 2012; 102, 74- 83.
5. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai TA, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 2003; 92(1-2), 79-185.
6. Greco C, Mastronardi C, Pagotto F, Mack D, Ramirez-Arcos S. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative Staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. *Transfusion*. 2008; 48, 969-977.
7. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2012; 33(26), 5967-5982.
8. Medeiros ES, Santos MV, Pinheiro Junior JW, Faria EB, Wanderley GG, Teles JAA, Mota RA. 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*. 2009; 29, 71-75.
9. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards. Document CLSI M7A-7, CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2005.
10. Peixoto RM, Amanso ES, Cavalcante MB, Azevedo SS, Pinheiro Junior JW, Mota RA, Costa, MM. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2012; 79, 101-105.
11. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. Lemos Editorial, São Paulo. 2000. 175p.
12. Amaral LA, Romano APM, Nader Filho A, Rossi Jr OD. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2004; 24, 173-177.
13. Medeiros ES, Freitas MFL, Saukas TN, Azevedo SS, Pinheiro Junior JW, Brandespim DF, Souza Neto OL, Mota RA. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011; 31, 499-504.
14. Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273, 18586–18593.

15. Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40, 254-261.
16. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39, 2151–2156.
17. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2007; 121, 1-7.
18. Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CF. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastite isolates. *Veterinary Microbiology*. 2007; 124, 187-191.
19. Cerqueira MCM. Anti-sepsia princípios gerais e anti-sépticos. In: Rodrigues EAC. *Infecções hospitalares prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier. 1997. Cap.4, 426-434.
20. Pedrini SCB, Margatho LFF. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2003; 70, 391-395.
21. Moreto T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and processing environment. *Applied Environment Microbiology*. 2003; 69, 5648-5655.
22. Langoni H, Domingues PF, Baldini S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*. 2006; 13, 51-54.