



**NÚBIA APARECIDA RIBEIRO**

**SUSCETIBILIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM BOVINOS  
A BIOCIDAS**

**LAVRAS – MG**

**2020**

**NÚBIA APARECIDA RIBEIRO**

**SUSCETIBILIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM BOVINOS  
A BIOCIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Colegiado do Curso de Zootecnia,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Bacharel em Zootecnia.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

**NÚBIA APARECIDA RIBEIRO**

**SUSCETIBILIDADE DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM BOVINOS  
A BIOCIDAS**

**SUSTAINABILITY OF PATHOGENS CAUSING MASTITE IN CATTLE TO  
BIOCIDES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Colegiado do Curso de Zootecnia,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Bacharel em Zootecnia.

APROVADO em 21 de junho de 2020.  
Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa - UFLA  
MSC. Dircéia Aparecida da Costa Custódio - UFLA  
MV. Maysa Serpa Gonçalves - UFLA

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a realização de mais um sonho.

Agradeço a meus pais José Márcio e Ana Maria por terem me dado todo o suporte necessário para conseguir estudar e concluir mais um ciclo da minha trajetória.

Agradeço à minha irmã Milena por me ajudar nos momentos de correria e sempre estar ao meu lado.

Agradeço ao meu namorado Guilherme pelas incansáveis vezes que me ajudou durante toda a graduação, inclusive no meu experimento para este trabalho de conclusão do curso. Agradeço também por toda paciência e amor comigo.

Agradeço ao meu orientador, professor Geraldo Márcio da Costa, por todo aprendizado e amizade durante estes anos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Bacteriologia do DMV, a cada um que me ajudou direta ou indiretamente no meu experimento (não vou citar nomes pra não correr o risco de esquecer de ninguém, mas se você esteve algum dia junto a mim no laboratório, sinta-se agradecido por mim), me fazendo companhia e tornando os dias no laboratório mais alegres.

Agradeço à Dircéia, grande amiga desde o início, quando ainda era do Programa Bic Júnior. Obrigada por compartilhar suas experiências e fazer parte dessa fase importante da minha vida.

Agradeço à professora Gláucia Mian, por sua ajuda e amizade. Obrigada por tudo!

Agradeço a todas amigas e amigos do curso de Zootecnia, que estiveram todos os dias comigo, sempre me apoiando e caminhando juntos.

Agradeço às minhas amigas e amigos do UFLALEITE, que sempre estiveram ali, como uma família, proporcionando um desenvolvimento profissional e principalmente pessoal, indispensável para eu me tornar quem sou hoje.

Agradeço à professora Marina Danes, por tudo que pude aprender (principalmente sobre desenvolvimento pessoal, sempre me fazendo refletir após as conversas) durante o tempo juntas no UFLALEITE. Obrigada por tudo!

Agradeço à Maysa e Dircéia, que juntamente com o professor Geraldo, aceitaram o meu convite para banca, vocês me acompanharam desde o início e fico feliz que tenham aceitado meu convite.

Agradeço ao DZO e a todos professores. Obrigada por todos ensinamentos e oportunidades!

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, por se tornar uma segunda casa, proporcionando um ambiente acolhedor, com espaços e estruturas que proporcionaram meu desenvolvimento todos esses anos. Gratidão!

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa fase da minha vida. Meu carinho e gratidão a cada um!

*“Nunca desista – nunca, nunca, nunca, nunca, em nada, seja grande ou pequeno, ambicioso ou discreto. Nunca desista, a não ser diante de convicções de honra e bom senso. Nunca ceda à força; nunca ceda ao poder devastador aparentemente avassalador do inimigo.”*

*Winston Churchill*

## RESUMO

A mastite se destaca entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos econômicos para a pecuária de leite no mundo. Para o controle e prevenção desta enfermidade, algumas medidas são fundamentais, como a limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha e a antissepsia de tetos, para isso, o uso de produtos químicos se torna essencial. O objetivo do estudo foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de produtos antissépticos contra agentes bacterianos causadores da mastite bovina. Foi utilizada a técnica de microdiluição para a obtenção das Concentrações Inibitórias Mínimas – CIM dos antissépticos. Os agentes bacterianos estudados foram: *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Os antissépticos e suas respectivas faixas de concentração testadas foram: clorexidina 0,1 - 0,004%; glutaraldeído 2,0 - 0,0078%; triclosano 0,5 - 0,0019%; peróxido de hidrogênio, ácido láctico e amônia quaternária 2,0 - 0,0078%; ácido peracético 0,2 – 0,0008% e iodo 0,5 – 0,0019%. Os resultados obtidos in vitro demonstram que o antisséptico clorexidina ação inibitória com sua menor concentração testada para todas as bactérias estudadas, demonstrando um amplo espectro de ação e o mais eficiente entre os antissépticos testados. O antisséptico triclosano apresentou boa ação antimicrobiana para SCN, *S. aureus* e *S. agalactiae* nas menores concentrações testadas, porém, não foi observada ação antimicrobiana eficiente para os isolados de *E. coli* nas concentrações utilizadas. Para *S. uberis*, apresentou CIM 50 em concentração mais próxima à maior concentração testada, demonstrando um espectro de ação menor para este antisséptico mesmo na sua maior concentração testada. A amônia quaternária demonstrou ação inibitória para SCN, *S. aureus* e *S. agalactiae*, inibindo 90% dos isolados com sua menor concentração testada. Para *E. coli*, apresentou ação inibitória nas concentrações intermediárias e altas testadas, e, para *S. uberis*, não observada ação antimicrobiana, mesmo na maior concentração testada. Os antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido láctico, ácido peracético e iodo apresentaram ação inibitória para todas as espécies estudadas, nas concentrações intermediárias e altas testadas. O glutaraldeído não apresentou ação antimicrobiana para nenhum dos isolados estudados, mesmo na maior concentração testada, sendo assim, não é indicado seu uso para prevenir e controlar a mastite causada por estes microrganismos.

**Palavras-chave:** Mastite bovina. Antissépticos. Susceptibilidade microbiana. Biocidas. Ação inibitória.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de bactérias utilizados no estudo -----	pg 23
Tabela 2 - Antissépticos e faixas de concentração testadas -----	pg 24
Tabela 3 - Resultados dos testes de CIM para <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa -----	pg 25
Tabela 4 - Resultados dos testes de CIM pra <i>Streptococcus uberis</i> -----	pg 26
Tabela 5 - Resultados dos testes de CIM para <i>Streptococcus agalactiae</i> -----	pg 27
Tabela 6 - Resultados dos testes de CIM para <i>Staphylococcus aureus</i> -----	pg 28
Tabela 7 - Resultados dos testes de CIM para <i>Escherichia coli</i> -----	pg 29

## SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO .....	10
2-	REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	11
2.1	Mastite Bovina .....	11
2.2	Agentes etiológicos da mastite bovina .....	13
2.2.1.	Gênero <i>Staphylococcus</i> .....	13
2.2.2.	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i> .....	14
2.2.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
2.2.4.	<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	16
2.2.5.	<i>Streptococcus uberis</i> .....	17
2.2.6.	<i>Escherichia coli</i> .....	18
2.3.	Uso de antissépticos no controle e prevenção da mastite bovina .....	19
3-	MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
3.1.	Local do estudo .....	22
3.2.	Isolados testados .....	22
3.3.	Teste de susceptibilidade aos biocidas .....	23
4-	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	24
4.1.	Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> .....	24
4.2.	Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para <i>Streptococcus uberis</i> .....	25
4.3.	Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	26
4.4.	Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
4.5.	Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para <i>Escherichia coli</i> .....	28
4.6.	Discussão .....	29
5-	CONCLUSÃO .....	30
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## 1- INTRODUÇÃO

Durante as últimas três décadas, a produção de leite bovino no mundo aumentou mais de 50%, chegando a 569 bilhões de toneladas em 2013 (FAO, 2016). No Brasil, a pecuária de leite se destaca com grande importância na economia. Atualmente, o país ocupa a terceira posição no ranking de produção de leite (FAO, 2017). Somente em 2019, foi captado 6,64 bilhões de litros, no último trimestre (IBGE, 2020).

Segundo o Censo Agropecuário (2017), o Brasil possui 1.176.295 propriedades leiteiras, e, além de participar ativamente no crescimento econômico do país, o leite tem papel importante no suprimento de alimento e geração de empregos e renda para a população (EMBRAPA, 2016). A atividade leiteira é praticada em mais de 1.000.000 de propriedades rurais e, apenas com a produção primária, agrega mais de três milhões de empregos e mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional (ANUALPEC, 2019).

Entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos econômicos para a pecuária de leite no mundo, a mastite se destaca com grande importância. É responsável por perdas produtivas, decorrentes por gastos com tratamentos, redução de produção dos animais afetados e gastos com descarte e reposição de animais que aumentam o custo de produção (SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite pode ser causada por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos, ou também por agressões físicas ou químicas. Existem cerca de 200 espécies de microrganismos que podem causar mastite, porém, até o momento, menos de 20 foram estudados a fundo (OLIVEIRA; MEDEIROS, 2015).

Cerca de 90% dos relatos de mastite em bovinos leiteiros estão associados a bactérias (LOPES et al., 2018), sendo as mais frequentes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium bovis*, *Mycoplasma* e coliformes (CARMO et al., 2013).

Como forma de prevenir e reduzir os males causados por essa doença, diversas estratégias podem ser adotadas, entre elas, a utilização de *dipping*, que é recomendada pelo National Mastitis Council (NMC) (NMC, [s.d.]). O *dipping* fundamenta-se na imersão dos tetos das vacas antes (pré *dipping*) e após (pós *dipping*) a ordenha em solução antisséptica, objetivando-se a redução da contaminação bacteriana e evitando possíveis infecções intramamárias (COSTA, 2014).

Variadas soluções antissépticas podem ser empregadas no *dipping*, sendo comumente usadas substâncias químicas como o iodo, a clorexidina e o hipoclorito de sódio. Todavia,

similar à resistência a antimicrobianos, as bactérias têm adquirido capacidade de resistir a antissépticos, principalmente por mecanismos de bombas de efluxo (DE GROOT, 2013). Neste contexto, torna-se necessário monitorar o perfil de susceptibilidade a biocidas através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), com o intuito de acompanhar o avanço e obtenção de resistência dos patógenos.

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de produtos antissépticos para agentes bacterianos isolados de leite de bovinos acometidos pela mastite.

## **2- REFERÊNCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Mastite Bovina**

A palavra mastite é derivada do grego “mastos”, que significa glândula mamária. O sufixo “ite” corresponde a inflamação, sendo então a mastite caracterizada pela inflamação da glândula mamária (COSTA, 1998). A mastite está relacionada a três fatores: animal, patógeno, ambiente. As bactérias correspondem a 80% das causas da doença (COSTA et al., 2013).

Essa enfermidade gera grandes prejuízos econômicos devido à redução da produção de leite, descarte do leite de vacas tratadas, depreciação na qualidade do leite, alto gasto com medicamentos, além de gastos com assistência técnica e reposição de vacas descartadas (GUIMARÃES et al., 2017).

Em um estudo realizado por Gonçalves et al. (2018) comparando quartos mamários afetados por microrganismos com quartos saudáveis, foi observado um menor retorno econômico dos quartos afetados, sendo a perda variando de US\$ 0,18 a US\$ 0,22 por quarto lactante por trimestre pela depreciação dos componentes do leite. Foi observado também uma redução de 0,07 Kg na produção de leite, o que gerou perdas de US\$ 0,02 a US\$ 0,40 por quarto lactante por trimestre.

O leite advindo de quartos lactantes afetados pela mastite manifesta alterações em sua composição, como os valores de proteína, lactose, gordura e seus demais nutrientes, o que influencia nas características sensoriais, vida útil e rendimento dos produtos derivados lácteos (CINAR et al., 2015).

A mastite pode ser classificada de duas maneiras: quanto a apresentação clínica da doença e quanto ao aspecto de transmissão do agente etiológico. A apresentação clínica da

mastite pode ser clínica ou subclínica, dependendo de fatores como o agente etiológico, o ambiente e características intrínsecas do animal acometido. Quando considerada clínica, apresenta sinais clínicos de inflamação no úbere (dor, rubor, calor, tumor e perda de função). O animal acometido por esse tipo de mastite pode manifestar febre, anorexia, depressão e alterações no leite, como presença de sangue e purulência (COSTA, 2014). Esse tipo de mastite pode gerar grandes perdas pelo descarte do leite, gastos com medicamentos, perda de função do quarto mamário afetado e até mesmo por morte do animal (SMITH, 1994).

Na forma subclínica, a mastite não apresenta sinais clínicos visíveis, nem no animal e nem no leite, sendo possível sua detecção no aumento considerável de células somáticas (CCS), mais frequentemente (KULKARNI; KALIWAL, 2013). Esse tipo de mastite traz maiores prejuízos por se apresentar de forma silenciosa, não despertando a atenção do produtor aos animais doentes (COSER et al., 2012).

Quanto a forma de transmissão do agente etiológico, a mastite é classificada tradicionalmente em contagiosa e ambiental. Quando contagiosa, é causada pelos microrganismos presentes na glândula mamária que são transmitidos durante a ordenha, pelas mãos do ordenhador ou pelo equipamento de ordenha, aos demais animais. De forma geral, os microrganismos considerados contagiosos são mais adaptados ao ambiente da glândula mamária, podendo causar mínimos sinais clínicos, apenas aumentando a CCS do leite do animal infectado. No Brasil, as bactérias contagiosas de maior prevalência são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Por outro lado, a mastite ambiental, na maioria das vezes, é causada por microrganismos oportunistas presentes no ambiente, como em fezes, lama, água e nas camas, no caso de vacas confinadas. Esses patógenos entram para o canal do teto quando o esfíncter se encontra aberto, geralmente em intervalos de ordenhas. Os principais patógenos ambientais no Brasil são *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus coagulase negativos*, outras espécies do gênero *Streptococcus* e coliformes, principalmente *Escherichia coli* (COSTA, 2014; FONSECA; SANTOS, 2000c; KULKARNI; KALIWAL, 2013).

No entanto, com o avanço nos estudos através de técnicas moleculares, tem-se observado uma dinâmica de transmissão bem mais complexa da mastite. Resultados contraditórios a essa classificação vêm sendo obtidos, observando espécies classificadas como ambientais apresentando características de adaptação ao hospedeiro, além de grande diversidade genética entre os isolados considerados contagiosos (RUEGG, 2012).

De acordo com o tipo de resposta imunitária, as mastites também recebem uma classificação. Mastites hiperagudas: apresentam começo repentino com aparecimento de uma inflamação severa e reação sistêmica marcada, podendo levar o animal a morte. Mastites

agudas: também de começo repentino e manifestações clínicas graves, porém, sem reações sistêmicas. Mastites subagudas: inflamação não muito evidente, porém com alterações persistentes no leite. Mastites crônicas: longos períodos com descargas celulares elevadas, mas sem colocar a vida do animal em risco (AIRES, 2010; RADOSTITS et al., 2007).

O processo infeccioso da mastite pode ser dividido em três fases: a primeira é a invasão, que é quando o patógeno adentra o canal do teto. A segunda é infecção, que é a multiplicação e colonização dos patógenos no tecido secretor da cisterna da glândula mamária. E a terceira fase é a inflamação, que segue a infecção e representa o início do episódio de mastite, com diferentes graus de alterações no úbere e no leite (RADOSTITS et al., 2007).

## **2.2 Agentes etiológicos da mastite bovina**

Através das dimensões territoriais brasileiras, é possível observar a diversidade de condições climáticas, sistemas de produção e densidade animal por área explorada, tornando fácil o entendimento da diversificação de agentes etiológicos da mastite bovina no país (ACOSTA et al., 2016).

A mastite pode ser causada por bactérias, leveduras, algas e vírus, porém, como já mencionado, cerca de 90% dos relatos da doença estão relacionados a bactérias (LOPES et al., 2018).

### **2.2.1. Gênero *Staphylococcus***

Entre os agentes etiológicos predominantes da mastite bovina, encontram-se as bactérias do gênero *Staphylococcus sp.* (Pyörälä e Taponen, 2009; De Vlieghe et al., 2012).

O gênero *Staphylococcus* é pertencente à família *Staphylococcaceae*, são cocos gram-positivos, aneróbios facultativos, catalase positivos, imóveis e não formam esporos (PRADO et al., 2015). São compostas por 47 espécies, sendo 23 subespécies atualmente conhecidas que formam colônias comensais nas mucosas ou tecido cutâneo, tanto em animais, quanto em seres humanos (PODKOWIK et al, 2013).

Trata-se de um gênero com grande heterogeneidade, atributo que o fez receber uma classificação baseada em procedimentos de diagnóstico com característica de produção de coagulase, o que facilitou a abordagem clínica para diferenciar espécies patogênicas *Staphylococcus aureus* de um grupo denominado *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) (BECKER et al., 2014).

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos primários. É classificado como coagulase positivo, enquanto os demais isolados, que apresentam reação negativa na prova de coagulase, são identificados como SCN (TOMAZI, 2013).

### **2.2.2. *Staphylococcus* coagulase negativa**

*Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) é um grupo de bactérias que estão relacionadas à mastite em bovinos de leite, trazendo prejuízos à qualidade do leite destinado para a indústria (MARTIN et al., 2015).

A mastite causada por SCN é de difícil controle, devido a heterogeneidade desse grupo. Existem cerca de 15 espécies de SCN associados a processos inflamatórios na glândula mamária (ZADOKS; WATTS, 2009).

As diferentes espécies desse grupo incluem *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. xylosus* e *S. haemolyticus*, entre demais espécies menos frequentes. São considerados agentes etiológicos menores da mastite, pois provocam poucas alterações no úbere e leite do animal acometido, porém, em situações de alta prevalência desses patógenos, podem causar grandes prejuízos (THORBERG, 2008).

Essa variedade de espécies do grupo, traz dificuldades na identificação espécies através de técnicas microbiológicas convencionais. Uma técnica que vem sendo utilizada é a técnica de MALDI-TOF MS, desenvolvida no final dos anos oitenta, que obtém níveis elevados de confiabilidade e agilidade na identificação de microrganismos (BIER et al., 2017 e CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012), inclusive a identificação de SCN em amostras de leite advindas de vacas acometidas pela mastite (HUBER et al., 2011; TOMAZI et al., 2014; NYMAN et al., 2017).

Nos seres humanos, os SCN podem ser encontrados na microbiota normal da pele, porém, cada vez mais, os SCN estão sendo relacionados a infecções graves, como bacteremia, endocardite, implantações de próteses e cateteres intravasculares (TUFARIELLO; LOWY, 2007; ZHU et al., 2012).

Um problema observado nas infecções causadas por SCN é a multirresistência aos antimicrobianos, como ao grupo do beta lactâmicos, que são muito utilizados para tratar infecções na glândula mamária bovina (IBRAHIM et al., 2015).

No Brasil, Machado et al. (2008) relataram *S. simulans* como a bactéria mais frequente. Em relação à sensibilidade a antimicrobianos, chama a atenção que estudos realizados no Brasil relatam alta frequência de isolados *Staphylococcus* spp. multirresistentes. Por exemplo, estudos

realizados na Bahia e Pernambuco indicam que 65,6% dos isolados (143/218) são multirresistentes a três ou mais antimicrobianos (Krewer et al. 2013); outro estudo realizado no estado de Goiás reporta 100% de resistência a penicilina, oxacilina e ampicilina para isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite de bovinos com mastites (Fontana et al. 2010).

*Staphylococcus coagulase negativos*, são considerados patógenos emergentes e oportunistas, sendo os derivados lácteos os principais alvos de contaminação e intoxicações alimentares causando riscos aos consumidores, devido à alta prevalência no leite bovino (IBRAHIM et al., 2015; TREMBLAY et al., 2013; CHAJE CKAWIERZCHOWSKA, 2015).

### 2.2.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é o patógeno de maior prevalência nas infecções intramamárias (PELLEGRINO et al., 2011). Seus principais reservatórios são os quartos mamários infectados, pele do úbere e tetos (FONTANA et al., 2010).

A alta prevalência observada nessa bactéria está relacionada à habilidade que ela possui em penetrar e se fixar de forma profunda dos tecidos mamários, tornando a mastite por esse patógeno, um desafio aos programas de controle e prevenção de infecções intramamárias (ZAFALON et al., 2008).

*S. aureus* se torna um problema de saúde única, pois há grande interação e adaptação desse agente ao homem, animal e ambiente, adquirindo genes responsáveis por potencializar os fatores de patogenicidade (SOUZA et al., 2017).

São diversos os vetores dessa bactéria, como a cama, na pele dos animais, tetos, amígdalas e nas mãos do ordenhador, favorecendo a disseminação e a alta contaminação (GAO et al., 2012).

A principal forma de disseminação do agente *S. aureus* ocorre durante a ordenha. Como controle da disseminação, evita-se a propagação para quartos mamários não infectados, através de higiene adequada na ordenha, terapia de vaca seca e descarte de vacas com mastite crônica que não apresentam resposta ao tratamento. Como parte da rigorosa higiene no momento da ordenha, é importante utilizar produtos antissépticos na limpeza dos tetos dos animais (pré e pós-dipping) (SILVA, 2016).

A infecção por esse patógeno ocorre através da colonização da extremidade do teto, principalmente através de lesões. A bactéria invade a cisterna e se estabelece no tecido secretor (CHAGAS et al., 2012). Se mantém nos ductos alveolares e é secretada continuamente,

apresentando risco para contaminação dos demais animais do rebanho. Uma multiplicação intensa desse agente pode resultar em abscessos e granulomas (HERMANS et al., 2010).

A taxa de cura das infecções intramamárias causadas por *S. aureus* são consideradas baixas, isso se dá principalmente por causa da ineficaz penetração dos antimicrobianos no local da infecção e pela resistência adquirida por essa bactéria, principalmente pela formação de beta-lactamases, que são enzimas que proporcionam resistência a antibióticos beta-lactâmicos, que são os mais utilizados nos tratamentos de mastites causadas por *S. aureus*, como as penicilinas, ampicilina e amoxiciclina (AIRES, 2010). Animais com infecções crônicas causadas por essa bactéria, muitas vezes são descartados precocemente (HAMED; ZAITOUN, 2014).

Vêm sendo estudados há muitos anos, formas de tratamentos alternativas para as infecções causadas por esse patógeno, visto que são classificados como os agentes patogênicos com maior importância para animais (BARRERA-RIVAS et al., 2017) e humanos (ALEGRE et al., 2016).

#### **2.2.4. *Streptococcus agalactiae***

A espécie *Streptococcus agalactiae* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacili*, ordem *Lactobacilales*, família *Streptococcaceae*, gênero *Streptococcus* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2018).

É uma bactéria gram positiva e oxidase negativa. Sua morfologia é apresentada na forma de cocos agrupados em cadeias enfileiradas. É imóvel e não forma esporos. É fermentadora e anaeróbia facultativa. Apresenta catalase negativa, o que permite diferenciá-la do gênero *Staphylococcus* (NETO P., 2011).

Na medicina veterinária é considerada uma bactéria de destaque na etiologia da mastite em bovinos (RATO et al., 2013), causando um forte efeito na qualidade do leite, nos níveis de produção e na contagem de células somáticas (CCS). No Brasil, sua prevalência é de 60% (KEEFE, 2012).

*S. agalactiae* é uma bactéria adaptada à glândula mamária da vaca, pouco resistente ao ambiente. A principal forma de transmissão se dá através de fômites contaminados, principalmente pela ordenhadeira mecânica. Esse microrganismo em bovinos, geralmente causa infecções subclínicas que tendem à cronicidade com grande impacto na CCS do leite, que pode ultrapassar 1.000.000 células/ml (KEEFE, 2012).

A mastite por *S. agalactiae* pode se tornar crônica se detectada tardiamente e evoluir para mastite clínica. Quando isso ocorre, são observados sinais clínicos que são divididos pelo

grau de severidade: grau 1 – somente alterações nas características fenotípicas do leite (coloração fica mais amarelada, presença de pus, sangue e/ou grumos); grau 2 – além das alterações no leite, o úbere fica inchado, o animal sente dor ao ser tocado nessa região que também apresenta vermelhidão; grau 3 – o animal apresenta alterações sistêmicas: febre, inapetência, desidratação e redução na produção de leite (MENDONÇA, 2010; FONSECA; SANTOS, 2000).

Para tratar a mastite em animais acometidos por esse agente, ainda é realizada a administração de antibióticos, que muitas das vezes é feita de forma indiscriminada. O problema disso se reflete na seleção de microrganismos com resistência a diversas bases utilizadas, como: eritromicina (19,5%), tetraciclina (35,6%), gentamicina (9,3%), clindamicina (20,3%), penicilina (3,4%), amicacina (38,1%) (DA SILVA et al., 2017).

Como estratégia para controle deste agente, recomenda-se realizar a *blitz* terapia, tratando simultaneamente todos os animais infectados, com objetivo de erradicar o agente do rebanho. No entanto, esta medida gera um custo significativo para o produtor (KEEFE, 1997; CRUZ et al., 2004). Além da *blitz* terapia, a antissepsia de tetos é uma medida importante para o controle deste agente, sobretudo o *pós-dipping* por se tratar de um agente contagioso (COSTA, 2014).

### 2.2.5. *Streptococcus uberis*

No Brasil, um dos *Streptococcus* ambientais isolados com maior frequência é o *Streptococcus uberis* (SOUTO et al., 2010). São cocos gram positivos e catalase negativos. Grande parte das infecções por este agente ocorrem nos meses iniciais da lactação ou no final do período seco (COSTA, 2008; RADOSTITS et al., 2007).

Cerca de 20 a 33% dos de casos de mastite em diversos países, são causadas por *S. uberis*. Esta bactéria apresenta capacidade de sobreviver fora da glândula mamária, podendo ser encontrada principalmente na sala de ordenha, porém, em casos de surtos, pode ser encontrada nas camas dos animais, fezes, exterior do úbere, parede abdominal, boca, narinas, vagina e cauda (NETO, 2011).

O *S. uberis* também apresenta a capacidade de formar biofilme (VARHIMO et al., 2011). Pode causa tanto casos clínicos como casos subclínicos de mastite (REINOSO et al., 2011). Um fator de risco apontado para sua ocorrência pode ser a pressão de vácuo da ordenhadeira. A infecção por *S. uberis* pode perdurar por um longo período e causar grandes perdas de produção de leite (ZADOKS; FITZPATRICK, 2009).

Quando infectados por *S. uberis*, os animais apresentam o quarto mamário com edema, firme, doloroso e pode haver febre e perda de apetite. O aspecto do leite se altera, se tornando mais aquoso. Porém, para diagnóstico definitivo, deve ser feita a cultura microbiológica para identificação do patógeno (AIRES, 2010; COSTA, 2008).

#### **2.2.6. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa pertencente ao grupo dos coliformes (FERNANDES, 2008). Possuem forma de bastonetes com extremidades arredondadas, medindo cerca de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro e 2,0 a 6,0 µm de comprimento. Não formam esporos e são anaeróbicas facultativas. Fermentam a lactose, são oxidase e catalase negativas e nitrato-redutase positivas. Pertencem à família *Enterobacteriaceae* e ao gênero *Escherichia*. Se apresentam individualmente ou em pares, podendo ser móveis ou imóveis, dependendo da presença de flagelo (MALUTA, 2012).

Esta bactéria apresenta um grande potencial em causar mastite em bovinos. Possui diversos fatores de virulência que contribuem para o aumento de sua capacidade em causar infecções (FERNANDES, 2008). Os fatores de virulência são necessários para que este agente consiga colonizar e infectar o animal, e dessa forma, driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro.

O principal fator de virulência para *E. coli* é a endotoxina, ou LPS, que compreende a porção lipopolissacarídea da parede desta bactéria. A endotoxina é responsável pela patogenicidade e reações inflamatórias associadas com a mastite. É liberada durante o crescimento e inativação da bactéria (MAIA, 2016; BURVENICH et al., 2007; HOGAN; SMITH, 2003). Adesinas, proteínas secretadas em células hospedeiras, capsulas de polissacarídeos, antígeno O, entre outros, também são fatores de virulência para *E. coli* (MAIA, 2016; LEHTOLAINEN, 2004).

As endotoxinas desta bactéria podem ser isoladas no leite e no sangue, sugerindo que os fatores de virulência podem estar associados a septicemia, podendo assim afetar os animais em períodos após a fase clínica (TOMAZI; SANTOS, 2015).

A mastite causada por *E. coli* se caracteriza por apresentar alta incidência de casos clínicos. Geralmente, a infecção apresenta curta duração e com manifestação sistêmica, sendo mais frequente no pré e pós-parto imediato, coincidindo com o período de imunossupressão (GREEN et al., 2007).

TOMAZI e SANTOS (2015) mencionam a bactéria *E. coli* como o principal coliforme causador de mastite clínica em bovinos. A sintomatologia pode variar de leve, com sinais inflamatórios no úbere, até mesmo à aguda, com sinais sistêmicos, como estase ruminal, desidratação, choque, e em alguns casos pode levar a morte do animal. A infecção é eliminada com o uso de antimicrobianos ou com a secagem do quarto mamário infectado, mas para a integridade de funcionamento da glândula mamária, pode-se levar mais tempo do que a melhora clínica da vaca afetada.

Controlar os sinais de toxemia que são inerentes à infecção através de fluidoterapia intensa e ordenhar os quartos afetados com maior frequência são formas de tratar os animais acometidos. O uso de antimicrobianos deve servir apenas de suporte para que a infecção seja eliminada e não ocorra cronicidade e nem situações de septicemia (AIRES, 2010).

Segundo SANTOS (2015) as infecções intramamárias por *E. coli* tem efeitos que vão além do impacto econômico direto por causa da mastite clínica. Podem ocorrer prejuízos a longo prazo sobre a produção e composição do leite do animal acometido, devido ao processo inflamatório, o que afetará o produto in natura e seus derivados. É importante ressaltar que o potencial de persistência dessas infecções ainda é uma informação relativamente nova, devendo ser considerada em práticas de manejo e prevenção de mastite nos rebanhos.

### **2.3. Uso de antissépticos no controle e prevenção da mastite bovina**

Antissépticos são soluções biocidas capazes de eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos presentes na pele e mucosas (PELOSI, 2017; REIS, 2011). Desinfetantes também apresentam a mesma função, porém são utilizados em superfícies inanimadas (CAMPOS et al., 2016). A eficácia dos biocidas é afetada por fatores como a concentração ou diluição do produto, sensibilidade do microrganismo e tempo de contato ou exposição do produto com o local onde deseja-se realizar a desinfecção, temperatura, presença de matéria orgânica, local a ser desinfetado, nível de conhecimento do manipulador do produto (DOMINGUES, 2010).

O uso de agentes biocidas no manejo de ordenha e limpeza dos tetos é fundamental para obter sucesso na atividade leiteira, já que se apresenta importante no controle e prevenção da mastite bovina (LOPES et al., 2013).

Para manter a saúde das vacas leiteiras, é fundamental uma higienização adequada. Executar os procedimentos de imersão dos tetos em soluções antissépticas, nas práticas de pré

e pós-*dipping*, se torna indispensável para redução da mastite contagiosa, além de reduzir também a mastite subclínica em até 90% (PEDRINI; MARGATHO, 2014).

O procedimento de *dipping* consiste na imersão dos tetos em uma solução antisséptica, com o objetivo de prevenir infecções na glândula mamária (SKOWRON et al., 2018). A imersão deve ser de pelo menos dois terços do teto na solução (COSER, 2012). Esse procedimento é dividido em duas etapas, o pré e o pós-*dipping*. O pré-*dipping* é realizado antes do ordenha, aplicando a solução nos tetos dos animais e deixando agir por pelo menos 30 segundos. Após este tempo, os tetos são limpos com papel toalha, removendo-se assim o produto. O pós-*dipping* é realizado após a ordenha dos animais, este por sua vez apresenta um carácter mais viscoso e não é removido dos tetos (COSTA, 2014).

O pré-*dipping* tem como objetivo diminuir a carga microbiana que está presente na superfície dos tetos, evitando que eles possam penetrar para dentro da glândula mamária durante a ordenha. Já o pós-*dipping* tem como objetivo eliminar os microrganismos presentes nos tetos após a ordenha, além de ser eficaz na prevenção de novos casos de mastite (FREITAS et al., 2011). A melhor forma de aplicação dos produtos tanto no pré quanto no pós-*dipping* é através do uso de canecas sem retorno (*one way*) para imersão de tetos, pois impedem o retorno da solução para o recipiente de armazenamento após a aplicação (COSER, 2012).

MIGUEL et al. (2012) fizeram um estudo comparando dois tipos de higienização dos tetos – uma realizada apenas com água e a outra com produto antisséptico – com a não higienização dos tetos antes da ordenha. Os resultados demonstraram a necessidade do uso de um produto antisséptico como pré-*dipping*, levando em consideração a redução da carga microbiana nos tetos após a sua utilização. Os autores também ressaltaram ser indispensável o uso de produtos biocidas na limpeza dos equipamentos de ordenha, considerada importante no trabalho de disseminação dos patógenos causadores de mastite.

Alguns fatores ligados ao produto antisséptico determinam o sucesso dos procedimentos de desinfecção e antisepsia, como a escolha apropriada do produto, que deve ser de acordo com o procedimento que deseja realizar, o preparo e aplicação do produto, observação do tempo de contato, manipulação correta após o uso e utilização de produtos eficazes, com garantia de qualidade (TEIXEIRA; VALLE, 2010).

Os principais compostos utilizados na assepsia de tetos são o iodo, clorexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. São usadas algumas bases e emolientes em suas formulações para reduzir possíveis irritações na pele dos tetos, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (PEIXOTO, 2015).

O iodo é um dos agentes biocidas mais antigos que se conhece (BLOCK, 1991). Tem espectro de ação contra fungos, bactérias gram positivas e negativas e alguns tipos de vírus, principalmente em sua forma de iodo livre (MORIYA; MÓDENA, 2008; ANVISA, 2010). Sua ação se baseia principalmente na oxidação dos grupos S-H dos aminoácidos e intervindo na função das proteínas (PANKEY et al., 1984; BLOCK, 1991).

A clorexidina é um antisséptico bastante utilizado no procedimento de antisepsia de tetos na fazenda. É um composto polibisguanida e apresenta ação antimicrobiana potente e prolongada, ficando nos tetos por até seis horas e sem causar reação tecidual (COUTINHO et al., 2012).

Este composto quando em contato com o alvo, inicia sua ação efetiva em 15 segundos, diminuindo rapidamente a carga microbiana. Seu efeito residual impede o desenvolvimento acelerado dos microrganismos por até seis horas. Atua com maior efetividade sobre bactérias gram positivas, apesar de também agir contra gram negativas, aeróbios e anaeróbios facultativos, fungos e alguns vírus (DA CUNHA et al., 2008; MORIYA; MÓDENA, 2008).

O efeito antimicrobiano da clorexidina se explica pela sua forte ligação em sítios aniônicos da membrana e da parede celular, particularmente nos fosfolipídeos e nas proteínas. Quando ligada, a clorexidina causa um desbalanceamento nos cátions ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) impulsionando a redução da fluidez da membrana, afetando a regulação osmótica e a capacidade metabólica da membrana e enzimas associadas, e conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo citosólico (GILBERT; MOORE, 2005; WHITE; MCDERMOTT, 2001).

Quando utilizada em doses mais altas, causa precipitação, coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte do microrganismo. Já em doses menores, ocorre alteração da integridade da membrana, resultando em extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (HJELJORD et al., 1973; HUGO; LONGWORTH 1964; RÖLLA; MELSEN 1975).

O glutaraldeído é um dialdeído saturado, é ligeiramente ácido, volátil e com odor pungente. Atua através da alquilação de grupos sulfidríla, hidroxila, carboxila e amino dos microrganismos, modificando o DNA, RNA e a síntese proteica (ANVISA, 2012). É um agente biocida que apresenta uma ação rápida e efetiva tanto para bactérias gram positivas quanto para as gram negativas (DRUGDEX, 2007).

O triclosano é um fenoxifenol, um dos compostos fenólicos mais utilizados como biocida (ANDRADE et al., 2011). Sua ação antimicrobiana está relacionada com sua capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos através da inibição enzimática, o que impede

a proliferação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CHEREDNICHENKO et al., 2012).

O peróxido de hidrogênio é um composto pertencente à família dos peroxigênios. Possui um amplo espectro, apresentando eficácia contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. Enzimas como a catalase e a oxidase que se encontram presentes nas bactérias, contribuem para o aumento da resistência desses microrganismos ao peróxido de hidrogênio em concentrações mais baixas. Age como oxidante, produz radicais livres de hidroxila (OH) que invadem componentes celulares essenciais (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O ácido láctico apresenta ação primária contra bactérias, incluindo aquelas que formam esporos, ele age na membrana celular desses microrganismos (BLOCK, 1991). Os compostos de amônio quaternário apresentam forte ação contra bactérias gram positivas e uma ação um pouco menor contra as gram negativas (NÓBREGA, 2013). O ácido peracético também é usado como biocida, atua através da desnaturação proteica, aumento da permeabilidade da membrana celular pela ruptura dos radicais sulfidríla (-Sh) e ligações de enxofre (SS), oxidando as enzimas microbianas essenciais (BEILENHOFF et al., 2008; RUTALA et al., 2008).

Apesar dos antissépticos serem de grande importância no controle e prevenção da mastite, seu uso indiscriminado pode desencadear um processo de resistência dos microrganismos, assim como ocorre com os antibióticos (RUTALA; WEBEER, 2008; CAMPOS et al., 2016). Mesmo que ainda a resistência aos antissépticos não seja um problema, o monitoramento constante dos compostos e sua forma de uso se faz necessário, uma vez que os microrganismos tendem a se adaptar para poderem sobreviver (JONES et al., 2004).

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Local do estudo**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.2. Isolados testados**

Os microrganismos testados e suas respectivas quantidades, estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Isolados de bactérias utilizados no estudo

Bactéria	Quantidade de amostras
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativo	54
<i>Streptococcus uberis</i>	43
<i>Streptococcus agalactiae</i>	52
<i>Staphylococcus aureus</i>	61
<i>Escherichia coli</i>	45

Fonte: Do autor (2020).

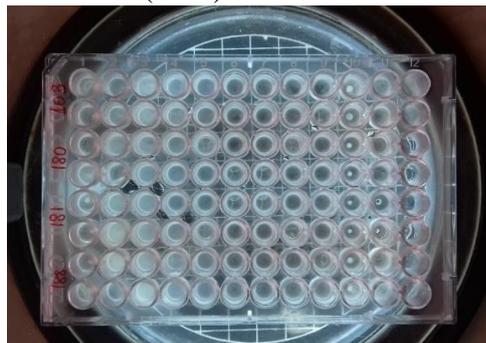
Todas as amostras pertencem ao banco de culturas do laboratório e foram isoladas na rotina de diagnósticos do mesmo, que presta serviço à comunidade recebendo amostras de leite para a realização de diagnóstico de mastite bovina. As amostras foram identificadas após testes primários e secundários padrões para cada espécie bacteriana. Após a confirmação dos testes, as amostras foram semeadas em meio de congelamento e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para conservá-las até o momento de uso.

### 3.3. Teste de susceptibilidade aos biocidas

Foi utilizada a técnica de microdiluição para a obtenção das Concentrações Inibitórias Mínimas – CIM. Para isto, foi utilizada uma adaptação da Técnica de Microdiluição em Caldo de acordo com *Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2018)*.

Fora testadas nove concentrações de cada antisséptico. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (FIGURA 1) e o intervalo das concentrações utilizadas está descrito na tabela 2.

Figura 1 - Microplaca com 96 poços utilizada para a técnica de microdiluição para obtenção das concentrações inibitórias mínimas (CIM).



Fonte: Do autor (2020).

Tabela 2– Antissépticos e faixas de concentração testadas

<b>Antissépticos</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Faixas de concentração (%)</b>
Clorexidina	20	0,1 - 0,0004
Glutaraldeído	85	2,0 - 0,0078
Triclosano	98	0,5 - 0,0019
Peróxido de Hidrogênio	30	2,0 - 0,0078
Ácido Lático	100	2,0 - 0,0078
Amônia Quaternária	100	2,0 - 0,0078
Ácido Peracético	2	0,2 - 0,0008
Iodo	2	0,5 - 0,0019

Fonte: Do autor (2020).

A escolha das concentrações foi baseada nas concentrações que já são utilizadas em antissépticos para pré e pós-*dipping* no dia a dia nas fazendas.

As amostras foram previamente descongeladas e semeadas em caldo Muller Hinton (Himedia® India). Após a semeadura, as amostras foram encubadas a 37°C por 24 horas.

Foi preparado para cada amostra, uma suspensão em solução salina (0,9%), ajustada à turbidez 0,5 da escala de Mc Farland que equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL

A partir da maior concentração testada para cada antisséptico, foram feitas oito diluições seriadas. Após a diluição dos antissépticos, acrescentou-se em cada poço da placa 10 microlitros do inoculo bacteriano, preparado em solução salina segundo a escala 0,5 de Mc Farland. Todas amostras foram testadas em duplicata e utilizando controles positivo e negativo de crescimento.

As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C, durante 24 horas e os resultados lidos visualmente, com auxílio de luz branca. O valor da CIM foi determinado como a menor concentração de cada antisséptico em que não foi possível a detecção visual do crescimento bacteriano.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para *Staphylococcus coagulase* negativa**

Os resultados obtidos nos testes de CIM para avaliar a susceptibilidade das bactérias *Staphylococcus coagulase* negativa aos antissépticos testados, estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados dos testes de CIM para *Staphylococcus* coagulase negativa

<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>		
<b>Antisséptico</b>	<b>CIM 50</b>	<b>CIM 90</b>
Clorexidina	0,0004	0,0004
Glutaraldeído	-	-
Triclosano	0,0020	0,0039
Peróxido de hidrogênio	0,0313	0,125
Ácido Lático	0,125	0,5
Amônia Quaternária	0,0078	0,0078
Ácido Peracético	0,05	0,1
Iodo	0,0313	0,0625

Fonte: Do autor (2020).

Os testes demonstram a maior eficácia contra a bactéria *Staphylococcus* coagulase negativa para o antisséptico clorexidina, que apresentou ação inibitória contra 100% dos isolados na sua menor concentração testada, 0,0004%.

Os antissépticos triclosano e amônia quaternária apresentaram ação inibitória para inibir 50% dos microrganismos na menor concentração testada.

Para os antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido lático, ácido peracético e iodo, os valores de CIM 50 foram mais elevados, com valores de respectivamente 0,0313; 0,125; 0,05 e 0,0313%.

Já para o antisséptico glutaraldeído, não foi observada ação antimicrobiana, pois mesmo a maior concentração testada não foi capaz de inibir o crescimento microbiano, com 100% dos isolados de SCN resistentes.

#### **4.2. Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para *Streptococcus uberis***

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a susceptibilidade das bactérias *Streptococcus uberis* aos antissépticos testados, estão relacionados na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes de CIM para *Streptococcus uberis*

<i>Streptococcus uberis</i>		
Antisséptico	CIM 50	CIM 90
Clorexidina	0,0004	0,0031
Glutaraldeído	-	-
Triclosano	0,25	-
Peróxido de hidrogênio	0,0313	0,125
Ácido Lático	0,0625	0,25
Amônia Quaternária	-	-
Ácido Peracético	0,2	-
Iodo	0,0078	0,0156

Fonte: Do autor (2020).

A clorexidina apresentou ação inibitória para 50% dos isolados em sua menor concentração testada, 0,0004% e eficiência para inibir o crescimento de 90% dos isolados *S. uberis* com concentração de 0,0031%.

Os antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido lático e iodo, apresentaram ação inibitória contra 50% dos isolados nas concentrações 0,0313; 0,0625 e 0,2%, respectivamente. Apresentaram também um potencial de inibição de 90% dos *S. uberis* estudados com as concentrações 0,125; 0,25 e 0,0156% respectivamente.

Triclosano e ácido peracético foram eficientes apenas para inibir 50% dos isolados, em concentrações intermediárias de 0,25 e 0,2%, respectivamente.

Já as concentrações de glutaraldeído e amônia quaternária testadas, não apresentaram ação antimicrobiana para nenhum dos isolados, mesmo na maior concentração utilizada.

#### 4.3. Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para *Streptococcus agalactiae*

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a susceptibilidade das bactérias *Streptococcus agalactiae* aos antissépticos testados, estão relacionados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados dos testes de CIM para *Streptococcus agalactiae*

<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Antisséptico	CIM 50	CIM 90
Clorexidina	0,0004	0,0004
Glutaraldeído	-	-
Triclosano	0,0020	0,0078
Peróxido de hidrogênio	0,0156	0,0313
Ácido Lático	0,25	0,25
Amônia Quaternária	0,0078	0,0078
Ácido Peracético	0,05	0,2
Iodo	0,0313	0,0625

Fonte: Do autor (2020).

Para todos os isolados de *S. agalactiae* estudados, foram obtidos resultados de ação inibitória eficazes dos antissépticos clorexidina e amônia quaternária, nas menores concentrações testadas, 0,0004 e 0,0078% respectivamente.

O antisséptico triclosano também apresentou bom resultado contra *S. agalactiae*, inibindo 50% dos isolados com sua menor concentração utilizada, 0,0020%, e 90% dos isolados com a concentração de 0,0078%.

Os antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido lático, ácido peracético e iodo, apresentaram concentrações inibitórias mínimas intermediárias e altas para inibir o crescimento de 50 a 90% dos isolados.

Glutaraldeído não apresentou ação antimicrobiana para os isolados de *S. agalactiae*, mesmo na sua maior concentração testada.

#### 4.4. Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para *Staphylococcus aureus*

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a susceptibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* aos antissépticos testados, estão relacionados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos testes de CIM para *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Antisséptico	CIM 50	CIM 90
Clorexidina	0,0004	0,0004
Glutaraldeído	-	-
Triclosano	0,0020	0,0039
Peróxido de hidrogênio	0,0313	0,125
Ácido Lático	0,25	0,5
Amônia Quaternária	0,0078	0,0078
Ácido Peracético	0,05	0,1
Iodo	0,0313	0,0625

Fonte: Do autor (2020).

Os antissépticos clorexidina e amônia quaternária apresentaram ação inibitória mínima para 100% dos isolados com suas menores concentrações testadas, 0,0004 e 0,0078% respectivamente.

O triclosano apresentou ação inibitória contra 50% isolados com sua menor concentração, 0,0020% e CIM 90 também em uma concentração baixa, 0,0039%.

A ação inibitória dos antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido lático, ácido peracético e iodo, tanto para 50 quanto para 90% dos isolados, foi observada em concentrações intermediárias e altas testadas.

O glutaraldeído não apresentou ação antimicrobiana contra os isolados de *S. aureus*, mesmo na maior concentração testada.

#### 4.5. Resultados dos testes de CIM dos antissépticos para *Escherichia coli*

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a susceptibilidade das bactérias *E. coli* aos antissépticos testados, estão relacionados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados dos testes de CIM para *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>		
Antisséptico	CIM 50	CIM 90
Clorexidina	0,0004	0,0016
Glutaraldeído	-	-
Triclosano	-	-
Peróxido de hidrogênio	0,0313	0,0625
Ácido Lático	0,25	0,25
Amônia Quaternária	0,0313	0,125
Ácido Peracético	0,1	0,1
Iodo	0,0156	0,0313

Fonte: Do autor (2020).

A menor concentração testada do antisséptico clorexidina, 0,0004%, foi capaz de inibir 50% dos isolados de *E. coli* e 90% dos isolados foram inibidos na concentração de 0,0016%.

Para os demais antissépticos testados, com exceção do glutaraldeído, que não apresentou ação antimicrobiana para *E. coli* mesmo na maior concentração testada, a ação inibitória, tanto para 50% dos isolados quanto para 90%, foi observada nas concentrações intermediárias e altas utilizadas.

#### 4.6. Discussão

No manejo de ordenha, as concentrações de clorexidina e iodo mais utilizadas no pré-dipping são de 0,3% para ambos. Os melhores resultados no pós-dipping são para as faixas de concentração de 0,7 a 1,0% para o iodo e 0,5 a 1,0% para clorexidina (SANTOS; FONSECA, 2006).

Em um estudo realizado por PEDRINI e MARGATHO (2003), a clorexidina demonstrou uma boa eficácia tanto para bactérias gram positivas quanto para gram negativas, em concentrações de 1 e 0,5%, o que mostra a viabilidade econômica deste produto quando se analisa a relação custo benefício. Além de apresentar um amplo espectro de ação, não causa irritação na pele e obteve os melhores resultados no estudo.

Até o momento existem poucos estudos referentes à suscetibilidade dos isolados utilizados neste trabalho aos antissépticos. Em um estudo realizado por DUTRA et al. (2017), foi observado que os SCN foram os agentes isolados em maior quantidade após a realização do

pré-dipping, demonstrando a importância de se conhecer a concentração ideal para inibição de seu crescimento.

Em um estudo realizado por RAMALHO et al. (2012), foram verificados altos índices de suscetibilidade *in vitro* de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros no estado de Alagoas, Brasil, frente a concentrações de clorexidina, iodo e amônia quaternária. MEDEIROS et al. (2009) ao avaliarem o perfil de sensibilidade de cepas de *S. aureus*, obtiveram resultados de 93% dos isolados sensíveis ao iodo, 82% à clorexidina, 55% à amônia quaternária e 15% ao ácido láctico. Para RIZZOTTO et al. 2018, a maior atividade antisséptica para *S. aureus* foi verificada para o iodo, seguido da clorexidina e do ácido láctico.

## 5- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos *in vitro* demonstram que o antisséptico clorexidina ação inibitória com sua menor concentração testada para todas as bactérias estudadas, demonstrando um amplo espectro de ação e o mais eficiente entre os antissépticos testados.

O antisséptico triclosano apresentou boa ação antimicrobiana para SCN, *S. aureus* e *S. agalactiae* nas menores concentrações testadas, porém, não foi observada ação antimicrobiana eficiente para os isolados de *E. coli* nas concentrações testadas. Para *S. uberis*, apresentou CIM 50 em concentração mais próxima à maior concentração testada, demonstrando um espectro de ação menor para este antisséptico mesmo na sua maior concentração testada.

A amônia quaternária demonstrou ação inibitória para SCN, *S. aureus* e *S. agalactiae*, inibindo 90% dos isolados com sua menor concentração testada. Para *E. coli*, apresentou ação inibitória nas concentrações intermediárias e altas testadas, e, para *S. uberis*, não observada ação antimicrobiana, mesmo na maior concentração testada.

Os antissépticos peróxido de hidrogênio, ácido láctico, ácido peracético e iodo apresentaram ação inibitória para todas as espécies estudadas, nas concentrações intermediárias e altas testadas.

O glutaraldeído não apresentou ação antimicrobiana para nenhum dos isolados estudados, mesmo na maior concentração testada, sendo assim, não é indicado seu uso nestas concentrações. Sugere-se estudos com concentrações mais altas.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. C. et al. **Mastites em ruminantes no Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

AIRES, T. A. C. P. (2010). **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. Master, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

ALEGRE, M.L.; CHEN, L.; DAVID, M.Z.; BARTMAN, C.; BOYLE-VAVRA, S.; KUMAR, N.; CHONG, A.S.; DAUM, R.S. **Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 colonization and skin infections on systemic immune responses in humans**. The Journal of Immunology, 197(4): 1118-1126, 2016.

ANDRADE, I. P. et al. **Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microorganismos da cavidade oral**. Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research, 2011. ISSN 2446-5410.

ANUALPEC. (2019). **Anuário da Pecuária Brasileira** (20th ed. Vol. 1). São Paulo, São Paulo, Brasil: Instituto FNP.

BARRERA-RIVAS, C.I.; HURTADO, N.A.V.; LUGO, G.M.G.; AGUIRRE, V.M.B.; PATIÑO, A.B.; JUÁREZ, M.C.; ALARCÓN, J.J.V. **Bacteriophage Therapy: An alternative for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections in animals and animal models**. In: Shymaa, E.; Alexander, L.E.C. *Frontiers in Staphy*

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. **Coagulase negative staphylococci**. Clin. Microbiol. Review. v. 27, p. 870-926, 2014.

BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N. et al. **Identificação por espectrometria de massa MALDI- TOF de *Salmonella* sp e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas**. Pesq. Vet. Bras. v. 37, p. 1373-1379, 2017

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada n.15 de 15 de março de 2012**. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. ANVISA; 2012.

CARMO, A. M. A.; SALES, R. C.; GRACINDO, A. P. A. C.; PEREIRA, G. F.; ABRANTES, M. R.; SILVA, J. B. A.; SOUSA, Ê. S. **Avaliação da sensibilidade in vitro a antimicrobianos de microrganismos isolados nos casos de mastite no município de Apodi/RN. IX CONGIC, Julho de 2013.**

CHAGAS, L.G.S. et al. **Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil.** Bioscience Journal, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, 2012.

COSER, S. M., LOPES, M. A., COSTA, G. M., **Mastite Bovina: Controle e Prevenção.** Boletim técnico- n.º 93, p. 1-30, 2012, Lavras-MG.

COSTA, E. O. **Importância da mastite na produção leiteira do país.** Educação Continuada, CRMV-SP, v. 1, n. 1, 1998.

COSTA, G. M. DA. **Mastite Bovina em Rebanhos Leiteiros da região Sul do Estado de Minas Gerais.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, et al. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil.** Arquivo Instituto de Biologia, São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

COUTINHO, L. C.A. et al. **Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite.** Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 61-65, 2012.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB G. **Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.** FEMS. Microbiol. Reviews. v. 36, p. 380-407, 2012.

CRUZ, J. C. M.; MOLINA, L. R.; BRITO, J. R. F.; CUNHA, R. P. L.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N. **Eficiência da blitz terapia na erradicação de *Streptococcus agalactiae* e**

**controle de *Staphylococcus aureus* em rebanhos bovinos leiteiros.** In: DÜRR, J. W. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p.136-140.

DA CUNHA, M.L.; PROCIANOY, R.S.; FRANCESCHINI, D.T.; CUNHA, M.L. **Effect of the first bath with chlorheridine on skin colonization with *Staphylococcus aureus* in normal healthy term newborns.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 40(8): 615-620, 2008.

DE GROOT, A. C. **Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects.** Dermatitis, v. 24, n. 6, p. 263–282, 2013.

DE VliegHER, S. et al. **Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control.** Journal of Dairy Science, v. 95, n. 3, p. 1025–1040, 2012.

DOMINGUES, P. F. **Desinfecção e Desinfetantes.** FMVZ-UNESP- BOTUCATU. s/a. p. 1-19, 2010.

FERNANDES, C. B. J. **Caracterização de fatores de virulência em isolados de *Escherichia Coli* de mastite bovina.** Viçosa 2008

FONSECA, L. F. L. DA; SANTOS, M. V. DOS. **Conceitos e Definições sobre Mastite Bovina.** In: Qualidade do Leite e Controle da Mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000c.

FONSECA, L. F. L. DA; SANTOS, M. V. DOS. **Contagem de Células Somáticas.** In: Qualidade do Leite e Controle da Mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000a. p. 176.

FONSECA, L. F. L. DA; SANTOS, M. V. DOS. **Qualidade Microbiológica do Leite.** In: Qualidade do Leite e Controle da Mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000b. p. 176.

FONTANA, V.L.D.S. et al. **Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da beta- lactamase em *Staphylococcus aureus*.** Revista de Veterinária e Zootecnia, 17(4):552-559, 2010.

GAO, J. et al. 2012. **Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis.** Vet. J. 194:423-424.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. **Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet.** Journal of Applied Microbiology, v. 99, n. 4, p. 703–715, 2005.

GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; MEDLEY, G.F. et al. **Cow, farm, and management of factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving.** J. Dairy Sci., v.90, p.3764-3776, 2007.

HAMED, M. I.; ZAITOUN, A. M. A. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis in dairy buffaloes farms.** International Journal of Livestock Research, v. 4, n. 3, 2014.

HERMANS, K. et al. *Staphylococcus*. In: GYLES C. L. et al. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** 4 ° edição ed. Iowa: Wiley-blackwell. p. 75-89, 2010.

HJELJORD LG, ROLLA G, BONESVOLL P. **Chlorhexidine-protein interactions.** J Periodontal Res Suppl. 1973;12:11-6

HUGO WB, LONGWORTH AR. **Some aspects of the mode of action of chlorhexidine.** J Pharm Pharmacol. 1964;16:655-62

IBRAHIM, M.S.B.; OKWONG, O.K.; BALA, A.N. et al. **Species of coagulase negative staphylococci isolated from anterior nare and milk animals and contacts persons in Maiduguri, Nigeria.** Ani. Vet. Sci. v. 3, p. 128-131, 2015

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>>.

KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; SPANGLER, E. **Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island.** Journal Dairy Science, v. 80, n. 3, p. 464-470, 1997.

KEEFE, G.P. **Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis.** Vet Clin Food Anim v.28, p. 203–216, 2012.

LEIGH, J. A. ***Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?** The Veterinary Journal, v. 157, n. 3, p. 225-238, 1999

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. **Review Article Bovine Mastitis: a Review.** International Journal of Recent Scientific Research, v. 4, n. 5, p. 543–548, 2013.

LOPES, L. O; LACERDA, M. S; RONDA, J. B. **Eficiência de Desinfetantes em Manejo de Ordenha em Vacas Leiteiras na Prevenção de Mastites.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Ano XI – v. 21, p. 1-9, 2013.

MAIA, V. P. **Mastite ambiental: prevenção é a melhor estratégia de combate.** Balde Branco, n622. 66-70 p. Agosto, 2016.

MALUTA, R. P. ***Escherichia coli* potencialmente patogênica isoladas de ovinos saudáveis criados extensivamente e de carcaças em matadouros.** 2012. 91 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

MARTIN, J.G.P. **Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal.** Thesis (Doctor's degree in Food Science and Technology) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. **Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance.** Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MEDEIROS, E. S. D. et al. **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, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009. ISSN 0100-736X.

MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. **Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização.** Medicina Ribeirão Preto, 41(3): 265-73, 2008. Murray, P.R. Manual of clinical.

NETO, F P; ZAPPA, V. **Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura**. Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária, v. 16, p. 1679–7353, 2011.

NÓBREGA, H. D. N. **Atividade antimicrobiana in vitro de produtos antissépticos-através da técnica time kill**. 2013.

PANKEY J.W.W.R.J., EBERHART A.L., CUMING R.D., DAGGETT R.J, FARNSWORTH & MCDUFF C.K. 1984. **Update on postmilking teat antiseptics**. J. Dairy Sci. 67:1336.

PEDRINI, SCB; MARGATHO, LFF. **Mastite bovina e o uso de antissépticos**. Pesquisa & Tecnologia, v.11, n.1, Jan-Jun 2014.

PEDRINI, S.; MARGATHO, L. **Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes**. Biológico, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.

PEIXOTO, MMR; GRESSLER, LT; SUTILI, FJ; COSTA, MM & VARGAS, AC. **Action of products based on chlorhexidine and iodine for the adhesion and consolidated biofilm of *Staphylococcus* spp. isolated from milk**. Pesq. Veterinária Brasileira, v.35, n.2, p.105-109, 2015.

PELLEGRINO, M.S.; FROLA, I.D.; ODIERNO, L.M.; BOGNI, C.I. **Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche**. Revista Eletrônica de Veterinária, v.12, n.7, 2011.

PELOSI, A. THE OPERATING ROOM. IN: TOBIAS, K.M., JOHNSTON, S.A. **Veterinary Surgery: Small Animal**. Elsevier, 2017. p. 601-641.

PODKOWIK, M. et al. **Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci**. International journal of food microbiology, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013. ISSN 0168-1605.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. **Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens**. Vet Microbiol, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, Feb 16 2009. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541- 62, 2007.**

RAMALHO, A. C. et al. **Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros.** *Pesq. Vet. Bras*, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

REIS, L.M.; RABELLO, B.R.; ROSS, C.; SANTOS, L.M.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em um serviço público de saúde.** *Revista Brasileira de Enfermagem*, 64(5): 2011.

RATO M.G., BEXIGA R., FLORINDO C., CAVACO L.M., VILELA C.L. & SANTOS-SANCHES I. 2013. **Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis.** *Vet. Microbiol.* 161(3):286-294

RÖLLA G, MELSEN B. **On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine.** *J Dent Res.* 1975;54 Spec No B:B57-62

RUEGG, P. L. **New Perspectives in Udder Health Management.** *VFP*, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2012.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite.** Editora Manole, Barueri, 2006. 314p.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** São Paulo: Manole, 2007. 313p.

SANTOS, M. V. **Prejuízos de longo prazo da mastite clínica causada por *Escherichia coli*.** 2015. Acesso em: 03/08/2020. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/prejuizos-de-longo-prazo-da-mastite-clinica-causada-por-escherichia-coli-205758n.aspx>.

SILVA, D.M. **Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina.** 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SKOWRON, K. et al. **Comparison of the effectiveness of dipping agents on bacteria causing mastitis in cattle.** *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 26, n. 1, p. 39–45, 2018.

SOUTO L.I.M., MINAGAWA C.Y., TELLES E.O., GARBUGLIO M.A., AMAKU M., MELVILLE P.A., DIAS R.A., SAKATA S.T. & BENITES N.R. 2010. **Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media.** *J. Dairy Res.* 77:63-70.

SOUZA, C.S.M.; TEIXEIRA, N.B.; CUNHA, M.L.R.S. **Community-associated *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in special groups.** In: Cunha, M.L.R.S *Staphylococcus aureus*. New York: Nova biomedical, 2017. p.25-34

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar.** SciELO-Editora FIOCRUZ, 2010. ISBN 8575413066.

THORBERG, B. **Coagulase-Negative Staphylococci in Bovine Sub-Clinical Mastitis.** Dissertação de Licenciatura, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Swedish University of Agricultural Sciences, 2008.

TOMAZI, T., SANTOS, V. M. **Prejuízos de longo prazo da mastite clínica causada por *Escherichia coli*.** 2015. Disponível em: [https://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p\\_prejuizos\\_de\\_longo\\_prazo\\_da\\_mastite\\_clinica\\_causada\\_por\\_escherichia\\_coli\\_5758.aspx](https://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p_prejuizos_de_longo_prazo_da_mastite_clinica_causada_por_escherichia_coli_5758.aspx) Acesso em: 03/08/2020.

TOMAZI, T. **Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por *Staphylococcus coagulase negativa*.** 2013. Universidade de São Paulo

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. **Biocides , drug resistance and microbial evolution.** p. 313–317, 2001.

ZADOKS R.N.; WATTS J.L. 2009. **Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping.** Vet. Microbiol. 134:20-28

ZAFALON, L.F. et al. **Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação.** Revista Instituto Adolfo Lutz, 67(2):118-125, 2008.

ZAITOUN, A. M. A. **Clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* in dairy buffaloes.** Assiut Veterinary Medical Journal, v. 54, n. 119, p. 289–310, 2008.