

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA**

JOSIELI SCHREIBER

**ANTISSÉPTICOS COMERCIAIS UTILIZADOS EM VACAS LEITEIRAS:
SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE A BACTÉRIAS E
LEVEDURAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**DOIS VIZINHOS - PR
2018**

JOSIELI SCHREIBER

**ANTISSÉPTICOS COMERCIAIS UTILIZADOS EM VACAS LEITEIRAS:
SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE A BACTÉRIAS E
LEVEDURAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao curso de Bacharelado em Zootecnia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Dois Vizinhos como requisito parcial para obtenção do título de ZOOTECNISTA.

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Tostes Frata

**DOIS VIZINHOS – PR
2018**



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Gerência de Ensino e Pesquisa
Curso de Zootecnia



**TERMO DE APROVAÇÃO
TCC**

**ANTISSÉPTICOS COMERCIAIS UTILIZADOS EM VACAS LEITEIRAS:
SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* FRENTE A BACTÉRIAS E
LEVEDURAS**

Autora: Josieli Schreiber
Orientadora: Profa. Dra. Marcela Tostes Frata

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADA em 12 de Junho de 2018.

Prof. Dra. Dinéia Tessaro

Prof. Juliano Zanela

Profa. Dra. Marcela Tostes Frata

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai, João, e minha mãe, Lourdes, que sempre me deram muito apoio, amor, carinho e compreensão. E, especialmente, à minha irmã Joseani, que em todos os momentos de fraqueza e desânimo estava ao meu lado dando muita força para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que realizou o meu sonho de estar cursando o Ensino Superior e que tem me dado força para lutar por sonhos maiores.

Aos meus pais, que sempre me deram força e entusiasmo para ser uma ótima profissional. Agradeço a eles pela minha vida. Agradeço pelos dias que sempre estavam à minha espera. Agradeço por terem toda paciência em meus piores momentos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que sempre me deram apoio e me auxiliaram no experimento.

Agradeço à minha nona Lucia Pizzi, por sempre ter feito orações para mim.

Agradeço à minha orientadora, profa. Marcela Tostes Frata pela ótima orientação que me proporcionou e, principalmente, por ter aceitado ser minha orientadora.

Agradeço aos professores, Dra. Maria Giovana Binder Pagnoncelli e Dr. Cleverson Busso, pela sugestões da primeira banca de defesa, e aos professores Dra. Dinéia Tessaro e Juliano Zanela por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desse trabalho.

Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos. Agradeço também à UTFPR, pelos anos de acolhimento.

Finalizo agradecendo aos demais que me acompanharam durante todo este percurso de vida acadêmica pela paciência, alegria, motivação e, principalmente, pelo companheirismo diário.

RESUMO

Schreiber, Josieli. Antissépticos comerciais utilizados em vacas leiteiras: susceptibilidade *in vitro* frente a bactérias e leveduras. 2018. 38 f. Trabalho de conclusão de curso – Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

O Brasil está entre os maiores produtores de leite do mundo. Para se produzir e comercializar leite de boa qualidade, medidas higiênico-sanitárias são necessárias, inclusive para o combate da mastite, causando prejuízos econômicos ao produtor e, conseqüentemente, diminuindo a produção. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito de dois antissépticos comerciais utilizados nos tetos das vacas leiteiras antes e após a ordenha, com o intuito de verificar sua atividade antimicrobiana sobre as cepas de *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os procedimentos metodológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, por meio do pH e das técnicas de difusão em disco e microdiluição em caldo, em triplicada, a fim de se obter a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). O pH dos produtos divergiu ao descrito no rótulo, podendo comprometer sua eficácia. No teste de disco-difusão a *E. coli* apresentou sensibilidade intermediária, enquanto que os demais microrganismos foram sensíveis aos produtos pré e pós-ordenha. Nos testes de microdiluição em caldo os microrganismos apresentaram sensibilidade frente aos produtos pré e pós-ordenha, permitindo verificar que apresentaram CIM e CBM mesmo diluídos, constatando-se que as combinações dos componentes utilizados nas formulações inibem os principais agentes etiológicos da mastite, embora não se recomende a diluição para uso.

Palavras-chave: Antimicrobianos, mastite, qualidade do leite.

ABSTRACT

Schreiber, Josieli. Commercial antiseptics in dairy cows: in vitro susceptibility to bacteria and yeasts. 2018. 38 f. Trabalho de conclusão de curso – Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Brazil is among the largest dairy producers in the world. In order to produce and market good quality milk, hygienic-sanitary measures are necessary, including to combat mastitis, causing economic losses to the producer and, consequently, reducing production. The objective of this study was to evaluate the effect of two commercial antiseptics used on the ceilings of dairy cows before and after milking, in order to verify their antimicrobial activity on strains of *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The methodological procedures were carried out in the laboratory of Microbiology of the Federal University of Technologic-Paraná, Dois Vizinhos, by means of pH and disc diffusion and microdilution techniques in triplicate in order to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). The pH of the products deviated from that described on the label and could compromise their efficacy. In the disc-diffusion test, *E. coli* presented intermediate sensitivity, whereas the other microorganisms were sensitive to the products pre- and post-milking. In the microdilution tests in broth, the microorganisms showed sensitivity to the pre and post-milking products, allowing to verify that they presented MICs and CBM even diluted, being verified that the combinations of the components used in the formulations destroy the main etiological agents of mastitis, although not dilution is recommended for use.

Key words: Antimicrobial, mastitis, milk quality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos específicos	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	O LEITE.....	11
2.2	A QUALIDADE DO LEITE	12
2.3	MASTITE	13
2.4	PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO TE MASTITE EM VACAS LEITEIRAS	15
2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.4.2	<i>Escherichia coli</i>	16
2.4.3	<i>Candida albicans</i>	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	TÉCNICAS EMPREGADAS	21
3.2	PROCEDIMENTOS	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	29
6	CRONOGRAMA	30
7	ORÇAMENTO	31
7.1	DESPESAS COM MATERIAL PERMANENTE	31
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de leite, ficando em 2016 em quinto lugar de produção mundial, produzindo 35 bilhões de litros, com destaque em demanda interna e produção acima da média comparada com outros países (CONAB, 2017).

O leite é um produto da secreção das glândulas mamárias, que se caracteriza como um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural (SGARBIERI, 1996). Os componentes do leite bovino são: água, proteínas, lactose, minerais e vitaminas, sendo comercializado em forma líquida integral, desengordurado e pasteurizado ou esterilizado, podendo essas mesmas formas serem comercializadas em parcialmente desidratadas e em pó (SGARBIERI, 2004).

Uma das doenças que mais afeta as glândulas mamárias das vacas leiteiras é a mastite, por meio de inflamações infectocontagiosas provocadas principalmente por bactérias e fungos, podendo, em sua incidência, acarretar prejuízos econômicos com tratamentos, aumento da mão-de-obra, descarte dos animais e, principalmente, redução da produção leiteira. Sendo a doença que mais onera o produtor de leite (GUIMARÃES, 2012). Esforços têm sido concentrados para reduzir sua incidência com programas de controle e prevenção (HOGEVEEN et al., 1992).

Para produzir e comercializar o leite de boa qualidade, fatores devem ser considerados, além da nutrição do animal, como a saúde da glândula mamária e o manejo da ordenha obedecendo a medidas higiênico-sanitárias, como o uso de antissépticos no pré-*dipping* e pós-*dipping* (CHAPAVAL, 2000).

Desse modo, justifica-se o estudo, pois a utilização de antissépticos para o combate da mastite é um programa de controle e prevenção utilizado em todo mundo, tendo como objetivo inibir e/ou destruir o crescimento de microrganismos nos tetos mamários das vacas leiteiras, na pré-ordenha (pré-*dipping*), prevenindo casos de mastite ambiental e na pós-ordenha (pós-*dipping*), evitando a mastite contagiosa (CHAPAVAL, 2000).

Assim, o presente estudo busca analisar a eficiência de dois produtos antissépticos comercializados para o pré e pós-ordenha, verificando se esses

têm cumprido seu objetivo de controle e prevenção, frente aos principais agentes etiológicos da mastite, contribuindo com a integridade da saúde das vacas leiteiras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano de dois produtos antissépticos comerciais utilizados em tetos de vacas antes (*pré-dipping*) e após (*pós-dipping*) a ordenha sobre agentes evidenciados em mastites bovinas com maior prevalência.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar o pH dos produtos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de dois produtos antissépticos utilizados no *pré-dipping* e no *pós-dipping* sobre as espécies de *Echerichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231), por meio das técnicas de difusão em disco e de microdiluição em caldo.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM);
- Verificar a concentração bactericida e fungicida mínima (CBM);
- Averiguar se os produtos comerciais cumprem com a função de controle e prevenção da mastite causada pelos agentes etiológicos testados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O LEITE

O leite é fonte de proteínas, cálcio, fósforo e vitaminas A, D, E, B1 e B2, sua gordura e lactose fornecem energia disponível, sendo um produto de importância social, ocupando destaque na oferta do consumo interno, como fonte básica de nutrientes de origem animal (LEDIC, 2002). O leite, segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2011, é o produto da ordenha completa, ininterrupta, em boas condições higiênicas, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

Pesquisas demonstram a importância da ingestão do leite nas diferentes fases da vida, por oferecer potenciais nutritivos, benéficos à saúde associados à alimentação equilibrada e à prática de exercícios físicos (FAO, 2013). Fatores genéticos, sanitários, ambientais e nutricionais são de interesse para produtores, técnicos e pesquisadores, por estarem ligados ao aumento da qualidade e produtividade leiteira no Brasil (TEIXEIRA et al., 2010).

A produtividade conduz à melhoria da situação econômica do sistema de produção, dessa forma, há necessidade de melhoria na qualidade do produto, uma vez que o mercado consumidor vem exigindo, mas as perdas por baixa qualidade são altas ocorrendo em todo processo produtivo, por contaminações, mamite, doenças infectocontagiosas, transporte inadequado, além de outros fatores (PEREIRA, 2000).

Apesar do Brasil contar com um dos maiores rebanhos do mundo, sua pecuária caracteriza-se por baixos índices de produtividade, grande número de pequenos produtores, rebanhos bastante heterogêneos e baixa qualidade do produto nas fazendas (PEREIRA, 2015).

O leite apresenta baixa qualidade pois grande parcela da produção vem de propriedades que não utilizam recursos tecnológicos mínimos, como ordenha mecânica, resfriamento do leite, ou mesmo estábulo com calçamento e água corrente, implicando nos principais parâmetros de qualidade higiênico-sanitárias (CHAPAVAL, 2000).

Em termos de aspectos nacionais relacionados à contagem das células somáticas e contagem bacteriana total do leite, os padrões se apresentam no Brasil muito além dos desejáveis (CHAPAVAL, 2000; VARGAS et al., 2013).

Por esses motivos, o Brasil implementou a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura que oficializou um Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). Essa normativa estabelece padrões mínimos para o recebimento do leite em relação a sua composição química (BRASIL, 2011).

As células somáticas presentes no leite são células de defesa que, ao detectarem agentes que causam a mastite, migram do sangue ao interior da glândula mamária, a fim de combatê-los, em uma glândula infectada as células presentes no leite chegam a apresentar 99% de células somáticas (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

O número de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), servem como base para o pagamento por qualidade ou penalidades para incentivar o controle de mastite, sendo esses padrões alterados pela Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 e pela Instrução Normativa nº 7, de 03 de maio de 2016 (BRASIL, 2016; GUIMARÃES & LANGONI, 2009).

2.2 A QUALIDADE DO LEITE

Para ser de boa qualidade, o leite não deve conter microrganismos patogênicos, ter baixo número na contagem das células somáticas e bactérias totais, não possuir corpos e sedimentos estranhos, ser levemente adoçado (CHAPAVAL, 2000).

Além disso, testes são realizados para analisar características bacteriológicas químicas e físicas, a fim de verificar se o leite é de boa qualidade. Esses testes devem ser empregados tanto no leite cru como no pasteurizado (CARUSO; OLIVEIRA, 1984).

Para tanto, é necessário coletar amostras e realizar testes físico-químicos, sensoriais que analisam a aparência, odor e sabor, microbiológicos que avaliam a contagem e o tipo de bactérias presentes no leite, sendo que se estiverem em grande quantidade podem indicar falta de refrigeração, leite velho,

mastite e ausência de medidas higiênico-sanitárias na produção e manuseio do leite (PEIXOTO, 2000).

As análises físicas e químicas compreendem o teste de sedimentação, sendo que a presença de sedimentos indica condições sanitárias indesejáveis; citocanálise do leite, que detecta processos inflamatórios da glândula mamária por meio da contagem das células somáticas; a densidade é utilizada para medir o teor de gordura e sólidos totais do leite; a acidez determina qualitativamente o teor de ácido láctico do leite; teor da gordura, tendo valor no controle da matéria-prima para a industrialização, como por exemplo para produção de manteiga (CHAPAVAL, 2000).

Também podem ser utilizadas outras análises como determinação de sódio; sólidos totais e desengordurados para os cálculos de rendimento industrial; teor de lactose e proteína; índice crioscópico, que verifica a temperatura de congelamento do leite indicando se houve adição de água ou outra substâncias; teste de conservantes e presença de antibióticos, que detecta substâncias ilegais que têm finalidade de conservar o leite ou que podem prejudicar a saúde do consumidor e a produção de derivados, entre outros (CHAPAVAL, 2000).

A legislação atual que estipula fatores de qualidade do leite é a Instrução Normativa nº 7 de 03 de maio de 2016, essa além de estender os prazos estipulados na Instrução Normativa nº 62/2011 para mais dois anos, modificou os limites básicos da CCS, que indica processos infecciosos na glândula mamária e da CBT, que caíram para 500 mil CCS/mL e 300 mil UFC/mL, respectivamente.

2.3 MASTITE

A mastite bovina está, no âmbito econômico, entre as doenças mais relevantes do gado leiteiro em todo o mundo, afetando diretamente a produção e qualidade do leite (PYORALA, 2002). Pode ser causada por bactérias, vírus, algas e fungos, tornando sua etiologia e epidemiologia complexas (COSTA et al., 2008).

É uma doença que acarreta na inflamação da glândula mamária em suas diferentes etiologias, promovendo algumas alterações no leite, como mudanças em sua cor, acidez, aparecimento de coágulos de diferentes tamanhos e número de leucócitos aumentado (PEIXOTO, 2000).

O agente etiológico classifica os tipos de mastite em ambiental e contagiosa. A ambiental é causada por microrganismo de origem fecal, como a *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2012).

A contagiosa é causada por patógenos que têm seu habitat no interior da glândula mamária e na superfície dos tetos, ocorrendo principalmente o contágio no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, panos e esponjas que secam os tetos quando utilizadas em várias vacas e teteiras (OLIVEIRA et al., 2012).

Em termos de patógenos, os principais causadores de mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. No Brasil, as mastites subclínicas geralmente se enquadram em contagiosas, o que acarreta maiores prejuízos à exploração leiteira (FONSECA; SANTOS, 2000).

O diagnóstico acontece pelo aparecimento de calor, dor e endurecimento da glândula mamária, verificados pela palpação. Apresenta-se de fácil identificação quando é clínica percebendo-se úbere inchado, glândulas e tetos doloridos, e presença de pus e sangue no leite (OLIVEIRA et al., 2012).

Há casos em que o diagnóstico não aparece na palpação nem pelo exame visual do leite, isso ocorre em grande parte dos casos subclínicos de mastite, sendo que o diagnóstico é realizado pela identificação da presença de células somáticas no leite. A mastite é caracterizada clinicamente pela expressão de defesa da glândula mamaria, o tecido lesado tentando generalizar-se e livrar-se do agente causador (OLIVEIRA et al., 2012).

A doença é decorrente da falta de procedimentos higiênicos nos equipamentos utilizados pelos ordenhadores, a própria falta de higiene dos ordenhadores nas roupas e mãos, falta de boa higiene dos tetos e úbere, e mal funcionamento da ordenhadeira mecânica, qualquer desses descuidos em um ou mais fatores conduzem ao aumento da contagem bacteriana total e no aparecimento de incidência da mastite (OLIVEIRA et al., 2012; SANTOS, 2006). Além disso, para manter a saúde das glândulas mamárias, evitando

contaminação de vacas saudas, a linha de ordenha deve seguir a ordem de vacas primíparas saudáveis, vacas múltíparas saudáveis, vacas já tratadas de mastite, vacas com mastite subclínica e por últimas vacas com mastite clínica em tratamento, onde o leite será descartado (SANTOS et al, 2012).

A contaminação do leite pode ocorrer por duas formas: por incorporação dos microrganismos presentes no úbere ao leite; ou pelo contato do leite com utensílios contaminados durante a ordenha, coleta ou armazenamento (FEHLHABRE, JANESTCCHKE,1995).

No meio ambiente há uma variedade de bactérias e leveduras que representam riscos à glândula mamária, podendo causar mastite, os seguintes agentes mais frequentemente envolvidos na etiologia desta doença: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *Sphaerophorus necrophorus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp*, *Candida albicans*, *Serratia marcescens* e *Mycoplasma urealyticum* (PEIXOTO, 2000).

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae* são encontradas frequentemente na pele do úbere, já a *Escherichia coli* no meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2012).

2.4 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DE MASTITE EM VACAS LEITEIRAS

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi descrita pela primeira vez no ano de 1880, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, encontrada em um pus cirúrgico. São cocos Gram e catalase positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, formadores de colônias pigmentados, sendo um dos patógenos mais comuns encontrados no mundo (SANTOS et al, 2007; JAY,1994).

O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies onde 17 dessas podem ser isoladas de amostras humanas, pertence à família *Micrococcaceae*. A espécie de maior interesse médico encontra-se principalmente em ambiente nosocomial,

que é o *S. aureus* relacionado com diversas infecções em seres humanos (CARVALHO, 2005; KONEMAN et al., 2001).

No início da década de 1930 iniciou-se as pesquisas e verificou-se que o *S. aureus* demonstrava resistência à sulfanilamida. Na década de 40 a resistência à penicilina foi detectada, em 1950 iniciou-se a produção penicilinases atualmente chamada de β -lactamases e passou a ser utilizada em pacientes hospitalizados (SANTOS et al., 2007).

Desde então novas cepas da bactéria tem se mostrado resistentes a cada antibiótico produzido para tratamento das patologias. Estudos sobre a susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite, demonstram aumento crescente no padrão de resistência de *Staphylococcus aureus*, o agente mais frequente isolado (LANGONI, 2013). Sua resistência é maior para antibióticos β -lactâmicos (BRITO et al., 2001).

É uma bactéria resistente à dessecação e ao frio, podendo se alojar em partículas de poeira por longos períodos fazendo com que sua distribuição seja abrangente, pode ser encontrada em ambientes de circulação humana, encontrada nas fossas nasais, garganta intestinos e pele, tendo o homem como seu principal hospedeiro (BANNERMAN, 2003; CARVALHO, 2005; CAVALCANTI et al., 2005).

O *S. aureus* é um patógeno humano que se dissemina desde infecções simples que envolvem a pele como, espinhas, furúnculos, celulite e impetigo e feridas, ou em casos mais graves pode causar pneumonia, meningite, osteomielite, síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras (SANTOS et al, 2007; BRASIL, 2018).

É um microrganismo patógeno que pode ser transmitido ao homem através de leite e derivados, tendo importância na epidemiologia das doenças vinculadas por alimentos (ZECCONI & HAHN, 2000).

Trata-se de um microrganismo de maior ocorrência nos rebanhos mundiais por ter grande resistência aos antibióticos, chegando a estar presente em 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al.,1999; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

2.4.2 *Escherichia coli*

É uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa, não esporulada, oxidase negativa, móvel por flagelos ou não móvel, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, fazendo parte da microbiota intestinal dos animais e não resiste aos tratamentos térmicos como a pasteurização (BRENNER, 1984; PRATA, 2009; TENAILLON et al., 2010).

Pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes, antigamente denominados de coliformes fecais, sendo descrita pela primeira vez pelo doutor Theodor Escherich em 1885, quando tentava isolar o agente etiológico da cólera (ESCHERICH, 1889; ADAM & MOSS, 1997).

As cepas de *E. coli* foram descritas como causadoras de diarreia em humanos, contudo também acomete animais como bovinos, ovelhas, coelhos e suínos (FISCHER et al., 1994; ROBINS-BROWNE et al 1994; ZHU et al., 1994; CID et al., 2001). Estudos permitiram então que a *E. coli* enteropatogênica fosse classificada em diferentes grupos conforme seus mecanismos e fatores de infecção e virulência (KAPER, 1994). Esses fatores de virulência são caracterizados por manifestações clínicas desde uma diarreia e colites agudas até disenteria que leva ao óbito, ocasionados por proteínas de adesão, de invasão e de proteínas tóxicas da *E. coli*.

Existem quatro tipos de *E. coli* causadoras de doenças gastrointestinais, a enteropatogênica, enterotoxigênica, enterohemorrágica e enteroinvasiva. A *E. coli* enterotoxigênica, fixa a mucosa do intestino e produz toxinas, causando diarreia aquosa, febre, cólicas, náuseas e fadigas, que podem durar de três a dezenove dias (ALVES, 2012).

A enteroinvasiva ocorre quando as células dessa estirpe são fagocitadas por uma célula da mucosa do intestino, se multiplicando e realizando a invasão de outras células (enterócitos), causando arrepios, fezes com presença de sangue, febre, dores abdominais, com duração de dias ou semanas, (ALVES, 2012).

A enteropatogênica acomete principalmente recém-nascidos, causando lesões nas microvilosidades intestinais, os sintomas se apresentam com diarreia, febre, arrepios, vômitos e náuseas. A profilaxia depende de programas de tratamento de água e esgoto em países em desenvolvimento, sendo sua transmissão oro-fecal (ALVES, 2012; FERNANDES & MEDINA-ACOSTA, 2002; FERNANDES E MEDINA-ACOSTA, 2004).

Por fim, a enterohemorrágica causa a morte das células do intestino grosso, os sintomas são diarreias com presença de muito sangue, vômito e sangue, sua incubação é de três a nove dias. Indivíduos afetados podem desenvolver doenças como a insuficiência renal aguda e trombose (ALVES, 2012).

É um microrganismo prevalente no meio ambiental, e as infecções mamárias por *Escherichia coli* são de forma clínica, apresentam-se de forma hiperaguda ou aguda, com aparecimento nas primeiras semanas pós-parto, se caracteriza pela difícil resolução terapêutica, em casos de comprometimento sistêmico, ocorre morte de animais por toxemia (JONES, 1990; RADOSTITS et al., 2000).

Os estudos que investigam fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina no Brasil são escassos (RIBEIRO, 2006).

2.4.3 *Candida albicans*

É um fungo dimórfico, estando associado à colonização assintomática ou em formas de pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Esse fungo pode obter a formação de clamidósporos, que possui a capacidade de se adaptar em diferentes ambientes biológicos, podendo ser considerado um organismo pleomórfico (ALVARES et al., 2007).

A *Candida albicans* é encontrada na flora normal de animais e homens, presente na cavidade oral, trato digestivo, respiratório e vaginal. Para alterar sua forma comensal para patogênica precisa de fatores locais e sistêmicos. (COLEMAN, 1996; SONIS et al., 1996; TOMMASI, 2000; ARAÚJO, 1994; CASTRO, 2000; REGEZI & SCIUBBA, 2000).

É uma espécie comum causadora de infecções no ser humano, contudo, o aparecimento do fungo não condiciona o aparecimento da doença, para que isso aconteça deve ocorrer a penetração nos tecidos. Dois fatores locais são responsáveis pelo aparecimento da candidíase, a umidade e a maceração da pele. É uma doença que precisa de fatores predispostos locais para seu aparecimento e possui baixa patogenicidade (SHAFER et al., 1987; ARAÚJO, 1994; REGEZI & SCIUBBA, 2000).

Segundo BARBEDO e SGARBI (2010) a maioria dos estudos mostram que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana normalmente é considerada uma micose oportunista. Sua importância ocorre pela frequência que coloniza e infecta os hospedeiros humanos em todas as partes do mundo, sendo a espécie com maior conhecimento patogênico.

No homem pode gerar desde uma infecção na mucosa até uma doença disseminada fatal, acometendo nesse último geralmente pacientes imunossuprimidos (SCULLY, 1992; BORAKS, 1999).

Nos últimos anos há relatos de diferentes infecções clínicas em animais, (DUARTE et al., 2001; PRESSLER et al., 2003; LINEK, 2004; MORETTI et al., 2004; KUWAMURA et al., 2006; FULLERINGER et al., 2006; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007), sendo a espécie *Candida albicans* a mais citada em casos de animais (VELASCO, 2000; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005; JADHAV & PAL, 2006; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007), contudo, outras espécies também aparecem na literatura como agentes infecciosos como a *Candida tropicalis*, a *Candida parapsilosis*, entre outras (MUELLER et al., 2002; PRESSLER et al., 2003; OZAWA et al., 2005; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

A *Candida* é facilmente isolada em equipamentos de ordenha, mãos do ordenador, sobre a pele que reveste o teto do animal e ambiente da sala de ordenha (KELLER et al., 2000; SANTOS & MARIN, 2005). O excesso de antibióticos para o tratamento de mastite causada por bactérias, vem produzindo uma seleção da microbiota que beneficia a condição de leveduras do gênero *Candida* a atuarem como causadores das infecções intramamárias (REY et al. 1997; GARCIA & BLANCO, 2000; ANDRADE, 2002).

Problemas de sanidade em rebanhos bovinos acometidos com inflamação das glândulas mamárias, desenvolvendo a mastite, aumentaram ao longo de 31 anos de $\leq 1\%$ para $\geq 17\%$, gerando impacto desfavorável à pecuária pela redução da produtividade e custos com tratamentos no mundo todo (KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007). No Brasil as espécies de *Candida* constituem o terceiro lugar de infecções de mastite, por meio de pele e secreção dos tetos, mãos de ordenadores, máquinas de ordenha, instrumentos de tratamento, condições

higiênicas do ambiente, alimentos, dentre outras, sendo o ordenador a principal fonte de infecção (MOTA et al. 1999; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TÉCNICAS EMPREGADAS

A pesquisa delimitou-se em analisar a susceptibilidade das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231), sobre dois produtos antissépticos comerciais à base de ácido láctico, sendo um utilizado na pré-ordenha (pré-*dipping*) e outro na pós-ordenha (pós-*dipping*).

Segundo descrição no rótulo, o produto pré-ordenha é composto por: ácido láctico (2%), clorexidina, peracético, tensoativo aniônico, emoliente hidratante, espessante, corante e excipientes, enquanto que o pós-ordenha contém: ácido láctico (5%), clorexidina, extrato de *Aloe vera*, camomila, tensoativo aniônico, emoliente hidratante, espessante, corante e excipientes.

O método de análise para a verificação do poder antimicrobiano dos antissépticos foi realizada pela técnica de disco-difusão em ágar, em triplicata, seguindo a metodologia descrita na norma M02-A12 do *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* (CLSI, 2015b). Após os testes em disco-difusão foram realizadas análises de microdiluição em Agar Muller Hinton a fim de se obter a concentração inibitória mínima (CIM) com maior precisão, seguindo a metodologia descrita na norma M07-A10, CLIM-27 do *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (CLSI, 2015a). A concentração bactericida mínima (CBM) seguiu sendo realizada conforme metodologia descrita por Koneman (2001).

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos.

3.2 PROCEDIMENTOS

Inicialmente realizou-se o preparo de pré-inóculo, com 24 horas de antecedência. Este procedimento consiste em adicionar uma alçada ou mais dos microrganismos da placa estoque em um frasco com 50 mL de meio de cultivo

Muller Hinton. As bactérias foram cultivadas em caldo Müller Hinton, enquanto que a levedura foi cultivada em caldo BHI e foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C/24horas.

A suspensão microbiana estava ajustada para que sua turbidez coincida com a da solução padrão de McFarland 0,5. Para a padronização das concentrações do inóculo, transferiu-se 1 mL do inóculo para uma cubeta estéril e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 625 nm.

Em seguida, calculou-se a quantidade necessária do volume de inóculo necessário para obter concentração de 0,8 a 0,10 de absorbância, considerando densidade ótica em comprimento de onda de 625 nm, equivalente a $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Este preparo foi realizado anteriormente para ambas as metodologias utilizadas: difusão em ágar e microdiluição em caldo.

Para o teste de difusão em ágar, realizou-se a diluição seriada dos produtos a testados em água destilada estéril. Um conjunto de discos de papel de filtro estéreis (6 mm) foram colocados na superfície de uma placa de ágar Müller Hinton semeada com os microrganismos a serem testados, cuja densidade ótica já foi ajustada. Os discos foram distribuídos por igual de maneira que a distância do centro para centro não excedesse 24 mm. Para as leveduras utilizou-se o ágar Müller Hinton suplementado com 2% dextrose e 5 µg/mL de azul de metileno.

Em cada disco ocorreu a aplicação de 5 µL dos produtos e suas diluições. As placas foram invertidas e colocadas em estufa de 35°C, até 15 minutos após aplicação dos discos.

Após 16 -18 horas os diâmetros dos halos foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco, usando um paquímetro ou uma régua.

No teste de microdiluição em caldo, o meio de cultura (100 µL) foi disposto em micropoços de uma microplaca estéril, sendo o caldo Müller Hinton para as bactérias e o BHI para a levedura. Os produtos a serem testados (100 µL) foram adicionados em triplicata. Realizou-se as diluições seriadas transferindo-se o volume de um poço para o poço seguinte, descartando o volume do último poço. O microrganismo foi então adicionado nesses poços.

As linhas G e H da microplaca foram utilizadas como os controles positivos, dessa forma, os controles de meio de cultivo, do crescimento do inóculo, das substâncias teste.

Para as bactérias *Escheriachia coli* e *Staphylococcus aureus* foram testadas diluições de Ampicilina e de Gentamicina. A microplaca foi incubada em estufa a 35°C/24horas. Para a levedura o mesmo procedimento foi seguido, porém utilizando-se o Fluconazol.

Após a incubação, adicionou-se em cada poço da microplaca 5 µL de solução de cloreto de trifeniletrozólio 0,5% e incubou-se por mais de duas horas antes da realização da leitura de CIM. A coloração vermelha indicou que as células estavam vivas.

Para a concentração bactericida mínima (CBM), após a incubação das microplacas, retirou-se uma alíquota de 10 µL de cada poço: dos dois poços antes e após da CIM (inclusive), e repicadas para o ágar Müeller Hinton, com o auxílio da alça de Drigalski, sendo as placas foram incubadas a 35°C/24horas.

As colônias foram contadas e considerada a concentração em que houve inibição maior ou igual a 90% de crescimento bacteriano e fúngico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos apresentaram pH de 5,6 (pré-dipping) e 6,5 (pós-dipping), contrariando os valores estipulados nos rótulos que eram na faixa de pH 4,0 a 5,0 em ambos os produtos. A *Escherichia coli* consegue crescer até em pH 4,5 ajustado com ácido clorídrico, mas não consegue crescer nesse mesmo pH quando ajustado com ácido láctico. Portanto, quanto mais próximos os produtos estiverem da neutralidade, menor será o efeito do pH na inibição desta bactéria, principalmente o produto pós-dipping. O *Staphylococcus aureus* é de 6,0 a 7,0 de pH, da *Candida albicans* é de 4,0 pH. Portanto, analisando-se somente o fator pH, os produtos poderiam não inibir a *E. coli* e a *C. albicans* e o pós-dipping não inibiria o *S. aureus*, visto que possuem pH dentro das condições de crescimento ótimo destes microrganismos.

No teste de disco-difusão em ágar, o diâmetro do disco utilizado foi 6 mm e foram considerados resistentes as bactérias que não apresentaram halo, sensíveis intermediários as que tiveram halos de inibição de ≥ 7 mm até 10 mm e sensíveis >10 mm, de acordo com Dominciano (2015). Nesta análise, o produto puro pré-dipping apresentou o halo médio de 8,3 mm, já o produto pós-dipping 8,0 mm frente à *Escherichia coli* (Figura 1), enquanto que para os antibióticos controle o halo foram de 13 mm para ampicilina, enquanto que o sulfazotrim não apresentou inibição.

Portanto, a *E. coli* apresentou sensibilidade à ampicilina, com sensibilidade intermediária aos produtos testados e resistência ao sulfazotrim, de acordo com o critério adotado.

Figura 1 – Halos de inibição da *Escherichia coli* com o produto *pré-dipping*



Fonte: A autora.

Apesar de não haver trabalhos utilizando o teste disco-difusão com ácido láctico sobre a *E. coli*, testes realizados com cepas de *Lactobacillus* produtores de ácido láctico, mostraram-se capazes de inibir a *E. coli* (PEREIRA & GÓMEZ, 2007; CHIODA et al., 2007; OGAWA et al., 2011; CÁLIX-LARA et al., 2014).

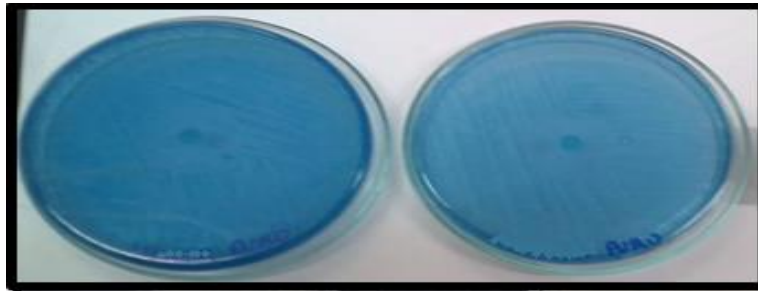
Verificou que frente ao *Lactobacillus* a *E. coli* apresentou zonas de inibição variando de 12 a 15 mm de diâmetro, sendo que a maioria apresentou 14 mm de diâmetro, consideradas como fortes halos de inibição (CHIODA et al., 2007). Em estudo conduzido por Pereira & Gómez (2007) ocorreu halo de inibição de 14,75 mm de diâmetro para *E. coli*. Apesar de nestes estudos poder haver outras substâncias produzidas pelo *Lactobacillus*, afirma-se que o agente inibidor foi o ácido láctico (PEREIRA & GÓMEZ, 2007; OGAWA et al., 2011).

O produto pré-dipping frente ao *Staphylococcus aureus* apresentou halo de 35,5 mm e o produto pós-dipping apresentou halo de 23,9 mm. Portanto, esta bactéria foi sensível a todos os produtos testados, bem como à ampicilina (controle), com halo de 42 mm.

De igual maneira, o ácido láctico produzido por cepas de *Lactobacillus*, produtora de ácido láctico, também tem sido estudada na inibição de *Staphylococcus aureus*, observando-se sucesso (PRASAD & GHODEKER, 1991; VARADARAJ et al. 1993; PEREIRA & GÓMEZ, 2007). Varadaraj et al. (1993) encontraram somente a inibição de *S. aureus* e não de *E. coli*, obtendo para as primeiras zonas de inibição entre 7 e 9 mm de diâmetro. Pereira & Gómez (2007) verificaram os melhores resultados de inibição pelo método de disco-difusão em ágar, com halos de inibição de 15,0 mm de diâmetro para o *S. aureus*.

A levedura *Candida albicans* apresentou halos de 25,4 mm para o produto pré-ordena e para o pós-ordena halo de 10,4 mm (Figura 2). Dessa forma, os produtos foram eficazes, devido à sensibilidade do agente enquanto que para o fluconazol (controle) o halo foi de 6,2 mm, portanto resistentes na concentração testada.

Figura 2 – Halos de inibição da *Candida albicans* com o produto pós-dipping



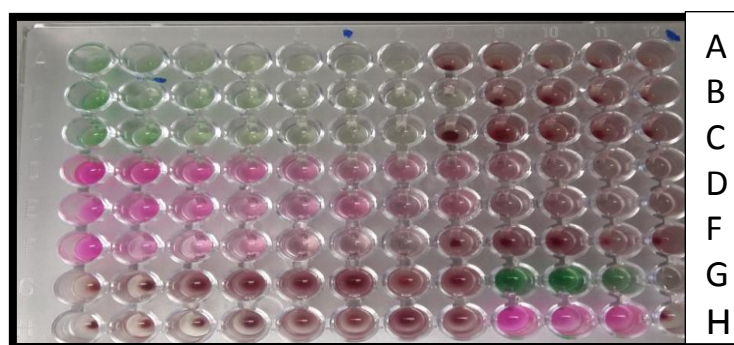
Fonte: A autora.

A *C. albicans* pode colonizar diferentes sítios do hospedeiro com valores de pH inerentes à cada região, podendo variar de pH 2 a 10. Embora resista ao pH ácido, requer condições alcalinas ou neutras para se converter para sua forma fúngica infectante (SHERRINGTON et al., 2017).

As espécies de *Candida* constituem a terceira maior causa infecciosa de mastites no Brasil e várias podem ser as fontes de contaminação, tais como: pele e secreção dos tetos, mãos de ordenadores, ordenhadeiras, instrumentos de tratamento, condições higiênicas do ambiente, alimentos, entre outras (BRITO et al., 2009). Portanto, a prevenção por meio de produtos pré e pós-ordenha com eficácia antifúngica são de extrema importância.

No teste de microdiluição em caldo verificou-se que o produto pré-dipping inibiu a *E. coli* com CIM de 0,008 a 0,016% de ácido láctico (Figura 3), com CBM de 0,016%. As fileiras A, B e C continham o produto pré-ordenha, e as fileiras D, E, F o produto pós-ordenha, as fileiras G e H os controles de meio de cultivo, da viabilidade do inóculo e das substâncias teste.

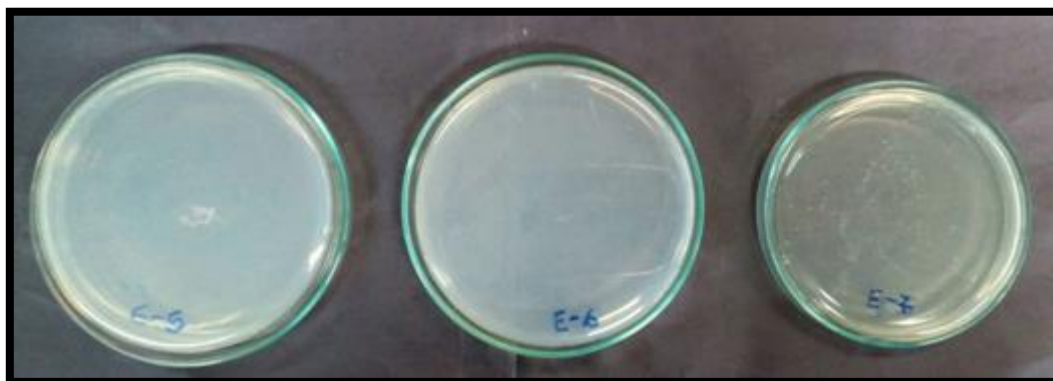
Figura 3 - Microplaca após a adição dos antissépticos testados, microrganismos testados e cloreto de trifeniltetrazólio



Fonte: A autora.

Já o produto pós-dipping apresentou CIM de 0,005 a 0,010%, e a CBM foi de 0,078% (Figura 3). Apesar da *E. coli* ter apresentado sensibilidade intermediária no teste de difusão em disco, constatou-se a CIM e CBM (Figura 4), por ser um teste de melhor sensibilidade.

Figura 4 - Verificação das diluições para determinação da concentração bactericida mínima do produto pós-ordenha para a *Escherichia coli*



Fonte: A autora.

Não foram encontrados na literatura informações a respeito da eficácia de produtos antissépticos à base de ácido láctico sobre os microrganismos testados utilizando-se a microdiluição em caldo.

Em estudo utilizando o método de microdiluição em caldo que avaliou a eficiência da oleuropeína (OLE) (composto fenólico extraído das folhas de oliveira) isolada e associada a sanitizantes comerciais, para inativação de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou-se que a *E. coli* apresentou menor resistência para cloreto de benzalcônio 1% (0,156 mg/mL), seguido de peróxido de hidrogênio 3% (0,234 mg/mL), ácido peracético 2% e digluconato de clorexidina 2% (0,312 mg/mL) (DOMINCIANO, 2015). Dentre os componentes dos produtos testados, ambos possuem ácido láctico, clorexidina e tensoativo aniônico, enquanto que o pré-ordenha possui ainda o ácido peracético.

O produto pré-dipping apresentou CIM de 0,004 a 0,008% de ácido láctico e CBM de 0,008%, enquanto que o produto pós-ordenha demonstrou a CIM de 0,005 a 0,010% de ácido láctico e CBM de 0,010% para o *S. aureus*, confirmando sensibilidade desta bactéria em relação aos produtos.

Em estudo conduzido por Dominciano (2015) observou-se que o *S. aureus* resultou em resistência menor para peróxido de hidrogênio (0,117 mg/mL), ácido peracético e hipoclorito de sódio (0,312 mg/mL).

Em estudo *in vivo* conduzido por Medeiros et al., (2009) constatou-se que 72,7% das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram sensibilidade frente ao ácido láctico a 2%.

Verificou que os produtos pré e pós-dipping apresentaram CIM de 0,016 a 0,031% de ácido láctico e CBM de 0,031% para a *Candida albicans*, embora tenham apresentados halos de tamanhos distintos no teste de difusão em disco.

Dessa forma, os produtos testados inibiram os agentes testados, inclusive após serem diluídos. Contudo, não é possível inferir que seja possível a diluição dos produtos a campo, visto que os testes aplicados não contemplam todas as variáveis vivenciadas a campo.

Em estudo conduzido por Coutinho (2012) o perfil de sensibilidade frente a leveduras foi de 66,67% com amônia quaternária a 4% de e 58,33% com ácido láctico a 2% no tempo de 30 segundos de ação no teto. Tais compostos químicos estão presentes nos dois produtos testados.

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita quando comparada ao número de drogas antibacterianas disponíveis. No grupo dos agentes químicos estão incluídos aqueles medicamentos que não são antibióticos no sentido direto, mas atuam como fungistático de modo indireto ao modificar as condições locais. Entre esses últimos, estão sais quaternários de amônio e os ácidos graxos orgânicos e derivados (ácido láctico, propiônico, undecilênico, butírico e caprílico) (NOBRE et al., 2002). Sendo assim, os produtos pré e pós-dipping possuem em sua formulação componentes que atendem à esta finalidade.

Em todos os testes de microdiluição em caldo não se observou crescimento de microrganismos contaminantes nos ensaios controle e todos apresentaram sensibilidade frente aos antimicrobianos controles testados.

5 CONCLUSÃO

O pH dos produtos divergiu ao descrito no rótulo, podendo comprometer sua eficácia.

Nos ensaios utilizando o teste de disco-difusão a bactéria *E. coli* apresentou sensibilidade intermediária, enquanto que os demais microrganismos foram sensíveis aos produtos pré e pós-ordenha.

Nos testes de microdiluição em caldo, microrganismos testados apresentaram sensibilidade frente aos produtos pré e pós-ordenha, permitindo verificar que apresentaram CIM e CBM mesmo diluídos, constatando-se que as combinações dos componentes utilizados nas formulações destroem os principais agentes etiológicos da mastite.

Apesar dos produtos possuírem capacidade de destruir os microrganismos após diluídos, não se pode inferir que poderão ser diluídos para uso, visto que o ensaio *in vitro* não reproduz resultados a campo em sua totalidade.

Portanto, reforça-se a importância da utilização de produtos pré e pós-ordenha na prevenção da ocorrência da mastite.

7 ORÇAMENTO

7.1 DESPESAS COM MATERIAL PERMANENTE

As despesas com material de consumo, para que a realização do experimento está listado no Quadro 2.

Quadro 2 – Despesas de materiais

Itens	Quantidade	Custo unitário	Custo do Item
Caldo MULLER HINTON	500 gramas	R\$ 500,00	R\$ 500,00
Microplaca de microtitulação 96 poços fundo U, estéril, com tampa.	10 unidades	R\$ 6,00	R\$ 60,00
Cloreto de Trifeniltetrazólio	15 gramas	R\$ 156,00	R\$ 156,00
Caldo Infusão cérebro coração (BHI)	500 gramas	R\$ 118,00	R\$ 118,00
Luva descartável	02 caixas	R\$ 25,00	R\$ 50,00
Fita crepe	02 rolos	R\$ 4,65	R\$ 9,30
Total de despesas			R\$ 847,30

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los alimentos**. 1ª ed. Zaragoza, Espanha: editorial Acribia, 1997. 473p.

ANDRADE, S. F. 2002. **Manual de terapêutica veterinária**. 2ª ed. Roca, São Paulo. 591p.

ÁLVARES CA, SVIDZINSHI TIE, CONSOLARO MEL. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**. J Bras Med Lab 43(5): 319-327, 2007.

ARAÚJO NS de, ARAÚJO VC de. **Patologia Bucal**. 1.ed. São Paulo: Artes médicas, 1994. p.51-53.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

BANNERMAN, T. L. **Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that aerobically**. In: MURRAY, P. R. *et al.* (eds.). *Man Clin Microbiol*. 8. ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. vol. 1, p. 384-404.

BARBEDO, Leonardo Silva; SGARBI, Diana Bridon da Graça. **Candidíase**. DST - J bras Doenças Sex Transm, Ed. 22 (1), p.22-38, 2010.

BORAKS S. **Diagnóstico Bucal**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p.106; 134; 149. 6. TOMMASI AF. Diagnóstico em Patologia Bucal. 3.ed. São Paulo: Pancast Editora, 2000. p.219-21; 506 e 507.

BRABES K,C,S. **Deteção de Staphylococcus spp e suas enteroxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite**. Lavras; 1999.Tese de doutorado, Universidade federal de Lavras.

BRASIL. Gram-positivos - resistência aos antimicrobianos. Staphylococcus aureus. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acesso em 20 de abril de 2018

BRASIL, 2002. **Instrução Normativa nº 51**, de 20 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, p. 6, Seção 1, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 7**, de 03 de maio de 2016. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, p. 11, Seção 1, 04 de maio de 2016.

BRENNER (D.J.): **Family I. Enterobacteriaceae** Rahn 1937, Nom. fam. cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958, 73; Ewing, Farmer, and Brenner 1980, 674; Judicial Commission 1981, 104. In: N.R. KRIEG and J.G. HOLT (editors), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, first edition, vol. 1, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984, pp. 408-420.

BRITO M. A. V. P.. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 53(5):531-537, 2001.

BRITO et al. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2655-2664, 2009.

CÁLIX-LARA, T. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. **Food microbiology.** v. 38 p.192 -200, 2014.

CARVALHO, C. et al. **Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica.** *J Pediatr*, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CARUSO, J. B.; OLIVEIRA, A. J. **Leite:** obtenção controle de qualidade e processamento. P.47-61. FEALQ, Piracicaba, 1984

CASTRO AL. de. **Estomatologia.** 3.ed. São Paulo: Santos, 2000. p.115-7.

CAVALCANTI, S. et al. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital.** *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 56- 63, 2005.

CHAPAVAL, Léa. **Leite de qualidade:** manejo reprodutivo, nutricional e sanitário. Viçosa: Aprenda facil, 2000.

CID, D.et al. **Association between intimin (eae) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids.** *Microbiology* 147:2341–2353, 2001.

CHIODA, T. P. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

COLEMAN GC, NELSON JF. **Princípios de Diagnóstico Bucal.** 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.195-8; 212 e 213.

COSTA, G. M; et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p. 1938-1942, out. 2008.

CONAB .Companhia Nacional de Abastecimento. **Leite e derivados**. Abril 2017. Disponível em:http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_15_14_13_38_leite_abril_2017.pdf. Acesso em 01 de outubro de 2017.

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. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, n.1, p.61-65, 2012.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.26-38, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2265.

DUARTE, E.R. et al. **Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil**. Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health, v.48, p.631-635, 2001.

ESCHERICH, T. **The intestinal bacteria of the neonate and breastfed infant**. *Rewies Infective Disease*; v.13; p.352-356, 1889.

FAGUNDES, H; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *staphylococcus áureas* e suas implicações em saúde pública. **Ciência rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1345-1320, julho-agosto, 2004.

FAO. Food and agriculture organization. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome; 2013.

FEHLHABER, K., JANITSCHKE, P. **Veterinarmedizinische lebensmittelhygiene**. Gustav Fischer Verlag: Jena, 1996

FERNANDES, R.C.S.C. AND MEDINA-ACOSTA, E. Diagnóstico da infecção por *Escherichia coli* enteropatogênica. **Revista pediatria atual** 15(3): 20-23, 2002.

FERNANDES, R.C.S.C. AND MEDINA-ACOSTA, E. Uso de antimicrobianos no tratamento da diarreia aguda infantil. **Revista pediatria atual** 17 (2): 8-12, 2004.

FISCHER, J., MADDOX, C., MOXLEY, R., KINDEN, D. and MILLER, M. Pathogenicity of a bovine attaching effacing *Escherichia coli* isolate lacking Shiga-like toxins. *Am. J. Vet. Res.* 55, 991–12, 1994.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

FULLERINGER, S.L. et al. **Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France**. *Poultry Science*, v.85, p.1875-1880, 2006.

GARCIA M. E. & BLANCO J. L. Principales enfermedades fungicas que afectan a los animales domesticos. **Revta Iberoam**. Micol. 17:S2-S7, 2000.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Vet. Zootec.** v.16, p.38-51, 2009.

GUIMARÃES, E. B.; FARIA, F. J. C.; GONÇALVES, J. L.; SILVA, L.; GOMES, M. F. F.; TERRA, V. J. B.; IV Mostra científica Famez, **Anais.** 2012. p.160-165.

HOGVEEN, H; DYKHUIZEN, A. A. Short- and long-term effects of a 2-year dairy herd health and management program. **Preventive Veterinary Medicine.** v.13, p.53–58,1992.

IOM – Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate.** Washington (DC: National Academy Press; 2004.

JADHAV, V.J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia,** v.23, p.233-234, 2006.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

JIN, Y.; LIN, D. **Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004).** Journal of the American Animal Hospital Association, v.41, p.373-381, 2005.

JONES, D. M.; NISBET, D .J. The gram negative bacterial flora of the avian gut. **Avian Pathology,** v.9, n.1, p.33-38, 1990. DOI: 10.1080/03079458008418383.

KAPER, J. B. (1994) **Molecular pathogenesis of enteropathogenic Escherichia coli.** In Miller, V. L., Kaper, J. B., Portnoy, D. A., and Isberg, R. R. (Eds.), Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis. American Society of Microbiology 12:173-195.

KELLER, B.; et al. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses,** v.43, supl.1, p.17-19, 2000.

KIVARIA, F.M.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. **Veterinary Journal,** v.173, p.617-622, 2007.

KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico microbiológico.** 5 eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

KUWAMURA, M. et al. **Systemic candidiasis in a dog, developing spondylitis.** Journal of Veterinary Medical Science, v.68, p.1117-1119, 2006.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. Pesquisa **Veterinária Brasileira,** v. 33, p. 620-626, 2013.

LEDIC, I. L.; et al. Estimativas de parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientes para as produções de leite no dia do controle e em 305 dias de lactação de vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.1953-1963, 2002.

LINEK, J. **Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans***. *Veterinary Ophthalmology*, v.7, p.159-162, 2004.

MEDEIROS, Sampaio de 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. **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n.1, p.71-75, 2009.

MORETTI, A. et al. Diffuse *cutaneous candidiasis* in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v.21, p.139-142, 2004.

MOTA, R.A. et al. Bovine mastitis caused by *Candida sp.*: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.2, p.101-103, 1999.

MUELLER, R.S. et al. **Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii***. *Veterinary Record*, v.150, p.728- 730, 2002

NOBRE et al., Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**. n.1, v.32, p.175-184, 2002.

OGAWA, M. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International journal of food microbiology**. v. 68, n.1, p.135 -140, 2001.

OZAWA, T.; Lopez-Villalobos, N.; BLAIR, H.T. 2004. **A survey of goat meat acceptability in Japan**. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 64:208-211.

PEIXOTO, A. M; et al. **Bovinocultura Leiteira - Fundamentos da Exploração Racional**. Fealq:2000, 3ª ed. 580p.

PHILPOT, W. N., NICKERSON, S. C. 1991. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros. 150p.

PRASAD, M. M.; GHODEKER, D. R. Antimicrobial activity of lactobacilli isolated from fermented milk products. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 26, n. 2, p.22-28, 1991.

PRATA, C. B. et al. A possível presença de *E. coli* O157:H7 em dejetos e carcaças de bovinos. **Revista Nacional da Carne**, v.383, p.88-93, 2009.

PYORALA, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**. [S.l.], v. 211, n. 216, p. 211-216, 2002.

PRESSLER, B.M. et al. **Candida spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome.** Journal of the American Animal Hospital Association, v.39, p.263-270, 2003.

REGEZI JA, SCIUBBA JJ. **Patologia Bucal- Correlações Clínico patológicas.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.0-25; 0-35; 76-80; 101.

REY J. E.; JIMENEZ E.; FRANJO C. 1997. Diagnóstico de las mamitis bovinas por microcalorimetria. **Med. Vet.** n. 14, p.162-168.

RIBEIRO, et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

ROBINS-BROWNE, R.M., TOKHI, A.M., ADAMS, L.M. and Bennett-Wood, V. (1994) **Host specificity of enteropathogenic Escherichia coli from rabbits: lack of correlation between adherence in vitro and pathogenicity for laboratory animals.** Infect. Immun. 62, 3329–3336, 1994.

SANTOS M. V. O uso da CCS em diferentes países, p.181-197. In: Ibid. (Ed.), **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil.** Talento, Goiânia. 352 p., 2006.

SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida spp.* From mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251- 253, 2005.

SANTOS et al. V Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região Sul do Brasil. **Anais.** 2012.330p.

SANTOS, A., L., et al. **Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar.** Bras Patol Med Lab. v. 43; n. 6; p. 413-423 ; dezembro 2007.

SONIS ST, FAZIO RC, FANG L. **Princípios e Prática de Medicina Oral.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.440.

SCULLY C. **Atlas de Diagnóstico Bucal.** 1.ed. São Paulo: Santos, 1992. p. 20 e 21; 52 e 53; 132 e 133.

SHAFFER WG, HINE MK, LEVY BM. **Tratado de Patologia Bucal.** 4.ed. Rio

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 397–409, 2004.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517 p., p.139-157.

SHERRINGTON et al. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLoS Pathog.** n.13, v. 5, 2017.

PEREIRA, JOSÉ CARLOS. **Vacas leiteiras**: aspectos práticos da alimentação Viçosa: Aprenda fácil.2000.

Radostits O.M., Blood D.C. & Gay C.C. 2000. **Veterinary Medicine**. 8th ed. Bailliere Tindal, London. 1773p.

TEIXEIRA, R. M. A.; et al. Desempenho produtivo de vacas da raça Gir leiteira em confinamento alimentadas com níveis de concentrado e proteína bruta nas dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2527-2534, 2010.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.207-217, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2298

TOMMASI AF. **Diagnóstico em Patologia Bucal**. 3.ed. São Paulo: Pancast Editora, 2000. p.219-21; 506 e 507.

VELASCO, M.C. **Candidiasis and Cryptococcosis in birds**. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v.9, n.2, p.75- 81, 2000.

VARADARAJ, M. C.; DEVI, N.; KESHAHA, N.; MANJREKAR, S. P. Antimicrobial activity of neutralized extracellular culture filtrates of lactic acid bacteria isolated from a cultured Indian milk product ('Dahi'). **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p.259-267, 1993.

VARGAS, D. P. de; et al. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, p.241-247, 2013.

ZECCONI, A.; HAHN, G. **Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk**. Bulletin of IDF, v.345, p.15- 18, 2000.

ZHU, C. et al. **Virulence properties and attaching-effacing activity of Escherichia coli from swine postweaning diarrhea**. Infect. Immun. 62: 4153-4159, 1994.