



Atividade dos desinfetantes iodóforo e composto quaternário de amônio sobre *Candida* padrão e isolados clínicos de mastite bovina¹

Activity of iodophor and quaternary ammonium compound disinfectants on Candida standard and clinical isolates of bovine mastitis¹

Felipe Lopes Campos², Patricia Valente³, Cesar Augusto Marchionatti Avancini*⁴

¹ Artigo obtido de trabalho na tese do primeiro autor, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Médico-veterinário, Doutor, Departamento de Defesa Agropecuária, Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI-RS). E-mail: felipe-campos@seapa.rs.gov.br

³ Bióloga, Doutora, Professora, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil. E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

⁴ Médico-Veterinário, Doutor, Professor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil. E-mail: cesar.avancini@ufrgs.br

Resumo: Na gestão sanitária das doenças infecto-transmissíveis, como o caso da candidíase, procedimentos são adotados sobre os agentes morbígenos tanto no corpo do paciente/animal, realizado por terapia antimicrobiana ou por antisepsia, quanto no ambiente, quando eles estão em vida livre, por procedimentos de desinfecção, sendo a escolha dos compostos químicos elemento decisivo para a prevenção ou o controle da enfermidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos compostos químicos desinfetantes e antissépticos iodóforo e cloreto de cetil trimetil amônio (do grupo quaternário de amônio), comumente usados em ambiente de ordenha bovina, sobre o padrão *Candida albicans* ATCC 14053 e 21 cepas de *Candida krusei*, nove de *Candida rugosa* e uma de *Candida albicans* isoladas em leite de vacas com mastite. O método foi o de diluição, pelo teste europeu de suspensão. A concentração inicial do iodóforo foi 100 ppm e do quaternário de amônio 1.000 ppm, tendo sido realizadas três diluições multiplicadas pelo fator 0,5 confrontando os inóculos na densidade populacional de 10⁶ UFC/mL, nos tempos de contato de 15, 30 e 60 minutos. Como resultado observou-se que mesmo as menores concentrações do iodóforo (25 ppm) e do quaternário de amônio (250 ppm), no menor tempo de contato inativaram tanto a cepa padrão quanto todos os isolados. Como conclusão, a atividade observada evidenciou não haver resistência ou tolerância dos inóculos e que os dois desinfetantes/antissépticos podem ser usados para controlar essas leveduras em ambientes com situação-problema de mastite bovina.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, candidíase

Abstract: In health management of infectious-transmissible diseases such as candidiasis, procedures are adopted against the pathogenic agents both in the body of the patient/animal, using antimicrobial therapy or antiseptics, and in the environment, when they are in the wild, through disinfection procedures, the decision made on the choice of the chemical compounds being a decisive element for the disease's prevention or control. This work aimed to evaluate the activity of the

disinfectant and antiseptic chemical compounds iodophor and cetyltrimethylammonium chloride (from the quaternary ammonium group), commonly used in environments where cows are milked, on the standard *Candida albicans* ATCC 14053 and 21 strains of *Candida krusei*, nine of *Candida rugosa* and one of *Candida albicans* isolated in milk from cows with mastitis. The method was of dilution, using the European suspension test. The initial concentration of iodophor was 100 ppm and of the quaternary of ammonium was 1000 ppm, with three dilutions undertaken multiplied by the factor 0.5, confronting the inocula in a population density of 10^6 CFU/mL, at contact times of 15, 30 and 60 minutes. As a result, it was observed that even the lower concentrations of iodophor (25 ppm) and of quaternary of ammonium (250 ppm), at the shortest contact time, inactivated both the standard strain and all the isolates. In conclusion, the activity observed evidenced that the inocula had no resistance or tolerance and that the two disinfectants/antiseptics may be used to control these yeasts in environments with problem situations of bovine mastitis.

Key-words: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, candidiasis

Autor para correspondência. E-mail: *cesar.avancini@ufrgs.br

Recebido em 12.7.2016. Aceito em 28.12.2016

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160058>

Introdução

A mastite é considerada economicamente a doença mais importante do gado leiteiro (RANGEL & MARIN, 2009) tendo sido observado, a partir da década de 1950/60, um aumento na incidência das mastites micóticas, possivelmente devido ao advento da antibioticoterapia antibacteriana (CRAWSHAW et al., 2005; WUNDER JR, 2007). Apesar de os fungos filamentosos estarem amplamente distribuídos na natureza eles são apenas esporadicamente isolados de casos de mastite, enquanto que as leveduras são os fungos de maior ocorrência (KELLER et al., 2000), e *Candida* spp. entre os gêneros mais frequentes (SANTOS & MARIN, 2005; COSTA et al., 2008; SPANABERG et al.,

2008; SPANABERG et al., 2009; DWORECKA-KASZAK et al., 2012).

Assim como para agentes causais bacterianos, a sua gestão sanitária necessita de procedimentos adotados no corpo do animal, através das terapias com antimicóticos, além da ação sobre os agentes morbígenos quando estão em vida livre, no ambiente.

Para TYLER & CULLOR (2002) existe relação direta entre o número de microrganismos presentes na superfície dos tetos, das teteiras e mãos do ordenhador e as taxas de infecções intramamárias, sendo a adequada higiene (limpeza e desinfecção/antisepsia) do úbere e do ambiente de produção uma importante medida na prevenção e no controle de enfermidades da glândula mamária.

Desinfecção é definida como o procedimento que visa eliminar microrganismos, com exceção de esporos, que estão em superfícies inanimadas, enquanto antissepsia tem o mesmo objetivo, mas é procedimento adotado sobre tecidos vivos. Fatores que afetam a eficácia da desinfecção incluem limpeza prévia da superfície, carga orgânica presente, tipo e nível de contaminação microbiana, as características dos microrganismos, a concentração e o tempo de exposição, presença de biofilmes, temperatura e pH (RUTALA & WEBER, 2008) e, assim como acontece o fenômeno de resistência dos microrganismos aos antibióticos, não existe microrganismo que eventualmente não possa apresentar resistência aos desinfetantes (CHAPMANN, 1998; McDONNELL & RUSSEL, 1999; MAILLARD & McDONNELL, 2012). Neste sentido, CABRERA et al. (2007) e EUROPEAN COMMISSION (2009) alertam que o uso indiscriminado dos antibióticos e a pressão seletiva ambiental, produzida por antissépticos, desinfetantes, conservantes e esterilizantes têm gerado uma resposta de sobrevivência nos microrganismos.

A resistência pode ocorrer devido a fatores intrínsecos do organismo ou pelo aumento de tolerância/adaptação ou mesmo

resistência adquirida por alteração genética com mecanismos moleculares de resistência aos compostos químicos antimicrobianos. Alguns organismos podem desenvolver a tolerância/adaptação (DAVIDSON & HARRISON, 2002; RIAZI & MATTHEWS, 2011; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013), que é a competência genético-bioquímica de apenas diminuir o efeito bactericida do antimicrobiano, sem alterar seu efeito bacteriostático. Esse fenômeno ocorre devido a prolongado tempo de exposição à determinado composto químico, como já demonstrado frente a desinfetantes. Também existem evidências de ocorrer resistência cruzada (*cross-resistência*) (SANGUINETTI et al., 2005), quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo, iniciando uma via comum de morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso a suas respectivas metas.

Se, por um lado, já existe significativa quantidade de estudos monitorando a ação dos antibióticos/antifúngicos sobre os microrganismos, por outro a investigação da atividade dos desinfetantes sobre esses organismos, ou a suscetibilidade destes organismos frente a esses compostos, não tem acompanhado o mesmo ritmo, principalmente no contexto da saúde e produção animal em nosso país. Neste

sentido, buscando instrumentalizar/auxiliar a escolha de desinfetantes e antissépticos como recurso sanitário na prevenção ou controle nas situações-problema de candidíase em mastite bovina, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos compostos químicos iodóforo e cloreto de cetil trimetil amônio (composto do grupo quaternário de amônio), comumente usados em ambientes de ordenha bovina.

Material e Métodos

O experimento foi realizado com cepa de *Candida albicans* ATCC 14053 e com *Candida* spp. isoladas em amostras de leite de vacas com mastite, recebidas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após o isolamento e imediato congelamento, a identificação foi feita no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e no Laboratório de Micologia Veterinária da Faculdade de Veterinária, ambos da UFRGS. Tomando-se o cuidado de selecionar isolados de propriedades diferentes, a coleção foi composta por uma *Candida albicans*, 21 *Candida krusei* e nove *Candida rugosa*. Os isolados ficaram congelados (-20°C) em meio de cultura e glicerol. Para os testes, foram reativados transferindo-se 0,2 mL para 3 mL de caldo Sabouraud Dextrose

(Himedia®) e incubado a 34°C, por 24h. Após, retiraram-se alíquotas com alça de platina para esgotamento em Agar Sabouraud Dextrose, e incubação a 34°C, por 24h. A densidade populacional de confronto foi de 10⁶ UFC/mL, obtida com escala McFarland.

Os dois compostos químicos desinfetantes foram obtidos na forma pura (Delaware®), com laudo técnico. As concentrações testadas foram escolhidas por referência de uso indicadas em produtos comerciais que utilizam esse princípio ativo na formulação, bem como por indicações bibliográficas (RUTALA & WEBER, 2008). Para obtenção de três diluições, a inicial foi multiplicada pelo fator 0,5: iodóforo (I - composto químico do grupo dos halogênios) 100 ppm (= 0,01%), 50 ppm e 25 ppm e cloreto de cetil trimetil amônio (QAC - composto químico do grupo quaternário de amônio) 1000 ppm (= 0,1%) , 500 ppm e 250 ppm.

Na avaliação da eficiência desinfetante foi usado o método de diluição, com o teste europeu de suspensão quantitativa da atividade fungicida e leveduricida de desinfetantes e antissépticos, conforme o protocolo do Comitê Europeu de Padronização EN 1657:2005 (BRITISH STANDARD, 2007).

Tanto a cepa padrão quanto os isolados foram submetidos aos desinfetantes nas três diluições preconizadas nos tempos de contato 15, 30 e 60 minutos. Adicionou-se 1 mL da suspensão a tubos contendo 9 mL da solução dos desinfetantes. Após o tempo de contato, uma alíquota de 1 mL foi retirada e adicionada a 9 mL de caldo Sabouraud Dextrose com agentes neutralizadores [*pool* 3% de polissorbato 80 (Synth®), 0,3% de lecitina de soja (Delaware®) e 0,1% de histidina (Synth®)], permanecendo por cinco minutos, após o que foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, em duplicata, e inoculadas por espalhamento de superfície em placa de Petri com Sabouraud Dextrose Agar, incubando-se a 34°C por 24/48 horas. Após o tempo de incubação procedeu-se a leitura das placas visando quantificar o crescimento de colônias.

Resultados e Discussão

A *Candida albicans* padrão foi inativada na menor concentração de cada um dos desinfetantes já aos 15 minutos de contato, o mesmo tendo ocorrido (Tabela 1) com todos os isolados de campo. Em função da inexistência de variabilidade matemática entre os resultados, seguiu-se apenas a apresentação descritiva dos dados.

A escolha do método e da técnica para avaliação da atividade dos desinfetantes

deu-se em função da legislação brasileira para o tema (BRASIL, 2007), onde é determinado que os produtos com ação antimicrobiana deverão comprovar sua eficácia mediante dois protocolos, entre eles o usado, do Comitê Europeu de Padronização (CEN, sigla em inglês). O protocolo do teste determina a utilização de neutralizadores. Os neutralizantes têm a função de inativar resíduos da substância antimicrobiana, após a exposição do inóculo (REYBROUCK, 1998).

Percebeu-se como vantagem o uso de neutralizadores posto que evitam resultados falsos-negativos, expressos pela ausência de crescimento microbiano devido somente a ação de inibição. Portanto, pode-se, com esse recurso, afirmar que os compostos desinfetantes/antissépticos promoveram ação fungicida e não fungistática.

Para interpretação dos resultados, o protocolo que descreve o teste determina que para ser demonstrada a eficácia do produto com ação antimicrobiana desinfetante/antisséptica é necessária a redução da densidade populacional do inóculo em, no mínimo, cinco unidades logarítmicas após determinado tempo de contato.

Diante da constatação de que os dois compostos químicos cumpriram esse requisito, tendo inativado todos os inóculos nas menores concentrações e tempo de contato confrontados

pode-se, então, considerá-los como desinfetantes adequados para controle de *Candida* spp.

Posto que os desinfetantes avaliados tiveram a mesma eficácia sobre os isolados de campo (situação-problema mastite) que sobre a cepa controle *Candida albicans* ATCC 14053,

pareceu ser esse um bom indicador biológico para ser usado como referência na avaliação da eficácia para desinfetantes e antissépticos indicados na prevenção e controle de candidíase em ambientes de saúde e de produção animal.

Tabela 1. Número de isolados (n=31) de *Candida* spp, com densidade populacional 10^6 UFC/mL, inativados frente a três concentrações dos desinfetantes iodóforo (I) e cloreto de cetil trimetil amônio (QAC– composto do grupo quaternário de amônio).

Concentração	Tempo de contato em minutos	I ci 100 ppm	QAC ci 1000 ppm
100%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31
50%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31
25%	15	31	31
	30	31	31
	60	31	31

ci = concentração inicial

Comparando com resultados relatados por outros pesquisadores, confrontando os desinfetantes testados com leveduras do gênero *Candida* padrões ou isoladas de origem animal, temos COUTINHO et al. (2012) que estudaram a sensibilidade de 12 fungos (11 do gênero *Candida* - *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e um *Trichosporum* sp) isolados do leite

proveniente de vacas com mastite, confrontados com antissépticos comerciais usados em pré e pós-dipping. O iodo, na concentração de 0,57% (= 5.700 ppm), inativou todos os isolados até 1 min de contato. O amônia quaternária (não informa qual o composto químico do grupo), na concentração inicial de 2% (= 20.000 ppm - diluído conforme fabricante, mas não informa o quanto) inativou 8 isolados em 30

segundos e 11 em um minuto, não descrevendo qual gênero ou espécie que resistiu até os 10 min (tempo de contato máximo). Percebe-se que obtiveram igual resultado de sensibilidade tanto ao iodóforo quanto ao quaternário de amônio, com também observou-se neste experimento, se bem que usaram concentrações muito mais elevadas.

REDÜ (2014) encontrou ação fungistática e fungicida do grupo quaternário de amônio sobre leveduras isoladas de animais silvestres, entre elas 8 espécies de *Candida* (*Candida famata*, *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. sphaerica*, *C. guilliermondii*, *C. ciferri*, *C. intermedia*, *C. globosa*). A concentração mínima de inibição foi de 0,0244 mg/mL, o que corresponde a uma concentração bem menor que relatamos neste trabalho. Mas no teste para verificar a ação de inativação a concentração mínima usada foi bem mais elevada, de 9,8 mg/ml, o que corresponde a quase dez vezes a concentração de 1.000 ppm.. E STOPIGLIA et al. (2012) relataram o uso de cloreto de cetil trimetil amônio frente trinta e uma *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) padrões ATCC, observando atividade fungicida entre 25 e 100 mg/mL, o que também são concentrações de confronto bem mais elevadas das testadas neste experimento.

DUARTE & HAMDAN (2006) confrontaram 12 *Candida* spp.(cinco *C.*

albicans , uma *C. castelli*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. krusei*, uma *C. lusitaniae*, uma *C. parapsilosis*, uma *C. pararugosa* e uma *C. tropicalis*) isoladas de vacas com otite, com iodo povidina (composto do mesmo grupo químico que o iodóforo) 1 % e 0,5%. Usando o mesmo teste adotado neste trabalho, observaram efeito microbida (redução da densidade microbiana) de 5 ou mais unidades logarítmicas dos isolados com o antisséptico, comprado com cultura controle, o que também verificou-se com os isolados em leite de vacas com mastite que confrontamos com o iodóforo.

Também AVANCINI & GONZÁLEZ (2014), com cepa de *Candida guilliermondii* isolada em mesas de exames e procedimentos em áreas do setor de pequenos animais de hospital veterinário de ensino, confrontado o iodóforo a 0,0025% (=25 ppm) e cloreto de cetil trimetil amônio em 0,025% (=250 ppm) observaram inativação, oque, para o gênero, é igual ao resultado agora apresentado.

O que verificou-se, confrontando os resultados desta pesquisa com os de outras investigações sobre a atividade fungicida dos compostos químicos avaliados, ou de outros compostos do mesmo grupo químico, é uma convergência sobre a eficácia que eles

possuem sobre as cepas, padrões ou isolados clínicos, testadas, o que reforça a confiança nos resultados obtidos neste experimento.

Conclusões

Os desinfetantes e antissépticos iodóforo e o quaternário de amônio - cloreto de cetil trimetil amônio - demonstraram atividade fungicida sobre a cepa padrão e os isolados clínicos de *Candida* spp., tendo os resultados evidenciado serem compostos químicos, nas concentrações testadas e observados fatores que podem limitar a ação, indicados para uso nas superfícies inanimadas ou animadas do ambiente visando o controle de mastites quando agente causal deste gênero estiver implicado.

Referências

1. AVANCINI, C.A.M.; GONZÁLES, H.N. Micro-organismos isolados em superfícies de mesas de exames e procedimentos descontaminadas de hospital veterinário e a inativação *in vitro* por desinfetantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 3, p. 440-450, 2014.
2. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da resolução GMC n.50/06. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 5 mar. 2007, Seção 1, p. 29.
3. BRITISH STANDARD. **BS EN 1657:2005** - Incorporating corrigendum no. 1. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative - suspension test for the evaluation of fungicidal or yesticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the Veterinary area – test method and requeriments (phase 2, step 1). Union Kingdom, 2007.
4. CHAPMANN, J.S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, p. 241-245, 1998.
5. CABRERA, C.E.; GÓMEZ, R.F.; ZUÑIGA, A.E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. **Colombia Médica**, v. 38, p. 149-158, 2007.
6. COSTA, G.M.; NIVALDO DA SILVA, N.; ROSA, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; Pereira, U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 1938-1942, 2008.
7. COUTINHO, L.C.A., MEDEIROS, E.S., SILVEIRA, N.S.S., SILVA, L.B.G. & MOTA, R.A. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 1, p. 61-65, 2012.
8. CRAWSHAW, W.M.; MCDONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Records**, v.156, p.812-813, 2005.
9. CRUZ, L.C.H. Micologia veterinária. 2ed. Rio de Janeiro:Revinter, 2010. 348p.
10. DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. **Foodtechnology**, VOL. 56, NO. 11 • p. 69-78, NOVEMBER 2002
11. DUARTE, E.R. & HAMDAN, J.S. Susceptibility of yeast isolates from cattle with otitis to aqueous solution of povidone iodine and to alcohol-ether solution. **Medical Mycology**, v. 44, p. 369 373, 2006.
12. DWORECKA-KASZAK, B.; KRUTKIEWICZ, A.; SZOPA, D.; KLECZKOWSKI, M.; BIEGAŃSKA, M. High Prevalence of *Candida* Yeast in Milk

Samples from Cows Suffering from Mastitis in Poland. **The Scientific World Journal**, v. 2012, Article ID 196347, 2012.

13. EUROPEAN COMMISSION (EU) - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCENIHR). **Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides**: antibiotic resistance effects of biocides. Brussels : European Commission, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2015.

14. KELLER, B.; SCHEIBL, P.; BLECKMANN, E.; HOEDEMAEKER M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses**, v.1, p.17-19, 2000

15. MAILLARD, J.Y.; MCDONNELL, G. Selection and use of disinfectants. **In Practice**, v. 34, n. 4, p. 292-299, 2012.

16. MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

17. REDÜ, J.F.M. Atividade biocida de desinfetante e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres matidos em centro de recuperação. 94p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/89993>>. Acesso em 10 Dez. 2015.

18. RANGEL P. & MARIN J.M.. Analysis of Escherichia coli isolated from bovine mastitic milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 363-368, 2009

19. REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 269 – 272, 1998.

20. RIAZI, S.; MATTHEWS, K.R.. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v 65 , p. 374-378, 2011.

21. RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008**. Centers for Disease Control (US), 2008.. 158 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf>. Acesso em: 10 out. 2016.

22. SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a Hospital Survey of antifungal. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 668-679, 2005.

23. SANTOS, RD; MARIN, JM Isolation of Candida spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 251-253, 2005.

24. SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v. 2013 Article ID 204237, 13 pages, 2013.

25. SPANAMBERG, A.; WÜNDER JR, E.A.; PEREIRA, D.I.B.; ARGENTA, J.A.; SANCHES, E.M.C.; VALENTE, P.; FERREIRO, L..Etiología de la mastitis bovina producida por levaduras en el sur de Brasil Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. Revista Iberoamericana de Micología, v. 25, n. 3, p. 154-156, 2008,

27. SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTÚRIO, J.M. & FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282-290, 2009.

28. STOPIGLIA, C.D.O.; COLLARES, F.M.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E.; FORTES, C.B.B; SAMUEL, S.M.W.; SCROFERNEKER, M.L.. Antimicrobial activity of [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride against *Candida* spp. **Rev Iberoam Micol.**,v. 29, n. 1, p. 20–23, 2012.
29. TYLER, J.W. & CULLOR, J.S. Sanidade e distúrbios da glândula mamária.In: SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. Barueri-SP: Manole, 2006. p.1019-1037.
30. WUNDER JR, E.A. Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do Planalto Médio, RS em 2005 e 2006. 59p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2007.

