

EFICÁCIA DA CLOREXIDINA *IN VITRO* CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE MASTITE NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

ISABEL LUIZA OLIVEIRA TEODORO¹; LUCAS SCHAEFER BATISTA²; MARIA EDUARDA FORTES GONÇALVES³; LUISA PEREIRA DE BARROS⁴; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE⁵; HELENICE GONZALEZ DE LIMA⁶

¹Universidade federal de Pelotas–
isabelxluiza@gmail.com

²Universidade federal de Pelotas– lbatistasul@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– eduardafortes.ma@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas– luisapdebarros@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas– pattsn@gmail.com

⁶Universidade federal de Pelotas– helenicegonzalez@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, mesófila, comensal de mucosas e pele de animais de sangue quente com elevado potencial patogênico (McVEY, 2016). Na medicina veterinária esse microrganismo é um dos principais agentes etiológicos da mastite em vacas leiteiras (SANTOS e FONSECA, 2019), com difícil tratamento. *S. aureus* faz parte das bactérias coagulase positivas, característica que dificultam a ação de antibióticos, de acordo com CHEUNG (2021).

Estudos recentes demonstram que mesmo antibióticos de última geração como a metilicina apresentam falhas terapêuticas devido ao desenvolvimento de resistência deste microrganismo (DA SILVA et al, 2018). O *S. aureus* é classificado como multirresistente, o que indica sua resistência a no mínimo três classes de antibióticos diferentes, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2021). Essa evolução bacteriana exige estratégias alternativas de controle, como a desinfecção pré e pós-ordenha com agentes sanitizantes mais potentes e protocolos combinados (SANTOS, 2024).

A técnica de pré-dipping e pós-dipping consiste basicamente na submersão completa de cada teto em uma solução antisséptica como clorexidina, iodo, hipoclorito de sódio, amônia quaternária e outros, a depender do nível de resistência. O teto fica imerso por 20 segundos (pré-dipping) e secado cuidadosamente com papel descartável. Após a ordenha o processo é repetido para selar o esfíncter (pós-dipping) (MILKPOINT, 2021). A clorexidina tem se mostrado eficaz mesmo contra cepas bacterianas mais resistentes, atuando na membrana citoplasmática dos microrganismos (FERREIRA, 2024).

A mastite é uma das doenças mais comuns na pecuária leiteira, ocasionando impacto econômico por perdas na produção. Este trabalho tem como objetivo verificar a eficácia *in vitro* do agente sanitizante clorexidina contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*, testando concentrações entre 0,4mg/ml e 20mg/ml, utilizando isolados de mastite sabidamente multirresistentes.

2. METODOLOGIA

Para a verificação de eficácia da clorexidina contra o *S. aureus* multirresistentes foram utilizados seis isolados, selecionados aleatoriamente, provenientes do banco de isolados do Laboratório de Inspeção de Produtos de

Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/UFPEL). Utilizou-se a metodologia de SANTOS et al (2021), que é uma adaptação do CLSI. Todos os isolados foram coletados de leite mastítico em rebanhos do sul do Rio Grande do Sul.

Os isolados foram recuperados em caldo Infusão-Cérebro-Coração (BHI, Kasvi) e semeados em placas contendo ágar Muller Hinton (Kasvi), por ser um meio não cromogênico. As colônias foram dissolvidas com solução salina 0,85% até atingirem a turbidez de 0,5 na escala McFarland. Esta suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller-Hinton, criando uma concentração final de aproximadamente 10^7 UFC/mL.

A avaliação da sensibilidade à clorexidina foi realizada utilizando uma placa de microdiluição de 96 poços, onde cada isolado foi testado em duplicata. Para tal, adicionou-se 5 µL da suspensão bacteriana em cada poço contendo 100 µL de caldo Muller Hinton, e 100 µL de clorexidina nas concentrações 20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 2,5mg/ml, 1,25mg/ml, 0,63mg/ml, 0,31, 0,16mg/ml, 0,8mg/ml e 0,4mg/ml, respectivamente. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, para confirmação da ação bactericida, alíquotas de 5 µL dos poços foram semeadas em ágar Mueller-Hinton e novamente incubadas por mais 24 horas a 37°C. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida como a menor concentração de clorexidina que não apresentou crescimento bacteriano após este período.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de concentração bactericida mínima com clorexidina demonstraram que todos os seis isolados de *S. aureus* multirresistente (Sta49, Sta102, Sta331, Sta343, Sta358 e Sta367), testados em duplicata, foram completamente inibidos em todas as concentrações avaliadas, desde 20 mg/mL até 0,4 mg/mL. Portanto, a CBM foi estabelecida em 0,4 mg/mL, pois essa foi a menor concentração testada capaz de impedir o crescimento bacteriano após a semeadura em ágar Mueller-Hinton.

Devido às características físico-químicas da clorexidina, que contém em sua composição digluconato em solução aquosa, não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que avalia a turbidez visível dos poços. Essa limitação é documentada no CLSI, pois o composto dificulta a leitura devido à sua própria coloração amarelo/esverdeada e propriedades de dispersão luminosa.

O resultado indica a alta eficácia antimicrobiana da clorexidina mesmo em quantidades reduzidas, sugerindo que o produto mantém sua ação bactericida contra o *S. aureus* em concentrações menores que aquelas utilizadas para sanitização, que variam entre 5mg/ml a 20mg/ml (RAMALHO et al, 2012). Porém o resultado de testes *in vitro* não condizem necessariamente com a eficácia *in situ*, a qual pode ser prejudicada por fatores como matéria orgânica, pH do ambiente e pouco tempo de contato (FERREIRA, 2024).

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que, mesmo diante das limitações visuais para avaliação da CIM com clorexidina, o teste de CBM mostrou a alta eficácia deste sanitizante contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. A

capacidade de destruição bacteriana em concentrações tão baixas quanto 0,4mg/ml representa uma descoberta importante para a saúde animal e humana. Por fim, os resultados reforçam o uso de clorexidina no protocolo de ordenha, após limpeza prévia adequada, das vacas de propriedades leiteiras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde**. Brasília: ANVISA, 2021.

CHEUNG, G.Y.C.; BAE, J.S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.

DA SILVA, M.O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17058/reci.v8i4.11580>.

FERREIRA, G.R.A. **Sanitizantes tradicionais vs naturais: desafio in vitro e in situ em bactérias multirresistentes**. 2024. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia.

MCVEY, S. KENNEDY, M. CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 617.

MILKPOINT. **Pré e pós-dipping: importância e cuidados**. Piracicaba, 12 abr. 2021. Acesso em: 15 agosto. 2025. Online. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/pre-e-posdipping-importancia-e-cuidados-225157/>.

RAMALHO, A.C.; SOARES, K.D.A.; SILVA, D.F.; BARROS, M.R.C.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; OLIVEIRA, J.M.B.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

SANTOS, B.J.F.; SILVA, E.L.; SOUZA, M.B.S.; SANTOS, T.C.N. Manejo sanitário em ordenha de vaca leiteira. **Revista Tópicos**, v. 2, n. 15, 2024. DOI: 10.5281/zenodo.14202009.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Controle de Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019. p. 301.