

Artigo original

Isabela Carvalho dos Santos¹
Danilo Ratti da Silva¹
Aliny Fernanda de Oliveira¹
Vanessa Rosaline de Oliveira¹
Lisiane de Almeida Martins¹

Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados no pré-dipping frente a amostras de *Staphylococcus* spp

Effectiveness *in vitro* disinfectants used in pre-dipping front of *Staphylococcus* spp. samples

A B S T R A C T

The microorganisms present during milking can be greatly reduced when the utensils are properly sanitized, and pre-dipping is performed with products that have proven efficacy, thus avoiding the proliferation of resistant microorganisms. The present study aims to verify the efficacy of the main disinfectants used, with varied concentrations, iodine 0.57%, chlorhexidine 2% and sodium hypochlorite 2%, against strains of *Staphylococcus* spp. For the accomplishment of this work, strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negative and *Staphylococcus* coagulase positive strains from clinical and subclinical bovine mastitis with exposure to disinfectants in the 15", 30", 60" and 120" times were tested for this work. Taking into account the results of the method used, the disinfectant that causes a greater sensitivity response was 2% chlorhexidine, mainly during the 30" and 60" times.

¹. Universidade Paranaense

KEY WORDS

Antimicrobial Activity; Mastitis; Milking; Sanitizers.

PALAVRAS-CHAVE

Atividade Antimicrobiana; Mastite; Ordenha; Sanitizantes.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Isabela Carvalho dos Santos
<isabela_carvalhoxd@hotmail.com>
Praça Mascarenhas de Moraes, 4282 - Centro, CEP:
87502-210 Umuarama - PR - Brasil

Submetido em: 03/08/2017

Aceito em: 10/12/2017

RESUMO

Os micro-organismos presentes durante a ordenha podem ter uma grande redução quando os utensílios são corretamente higienizados e realiza-se o pré-dipping com produtos que possuem eficácia comprovada, evitando, assim, a proliferação de micro-organismos resistentes. O presente trabalho tem como objetivo verificar a eficácia dos principais desinfetantes utilizados, com concentrações variadas: o iodo 0,57%, clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2%, frente a cepas de *Staphylococcus* spp. Para a realização deste trabalho foram testadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva, advindas de caso de mastite bovina clínica e subclínica, com exposição aos desinfetantes nos tempos de 15", 30", 60" e 120". Levando-se em consideração os resultados do método utilizado, o desinfetante que causa uma maior resposta de sensibilidade foi o clorexidina a 2%, principalmente durante os tempos de 30" e 60".

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é um quadro de inflamação das glândulas mamárias, sendo majoritariamente causada por bactérias. Ela pode se apresentar na forma clínica, com presença de quadros sintomáticos, ou de forma subclínica, em que os sinais não estão evidenciados. A mastite é uma das maiores causadoras de perdas econômicas da produção leiteira, pois diminui a produção e interfere na qualidade do leite que é vendido (TOZZETTI, et al, 2008; CASTRO, 2001).

As medidas preventivas contra a disseminação das mastites, clínicas ou subclínicas, além de prevenir uma perda estimada de 10% das cabeças do rebanho, representam menos de 10% do impacto econômico anual das propriedades leiteiras, validando a preocupação, e a exigência, de um melhor controle e atenção dos profissionais diretamente ligados à produção (COSTA, 1991; DEMEU et al., 2011). Por conta disso, enfatiza-se o uso de um esquema sanitário eficaz contra o desenvolvimento de fontes de infecção no decurso do manejo dos animais, antes da ordenha, no pré-dipping, que nada mais é que a desinfecção do teto através de imersão em sanitizantes, durante a ordenha, e no pós-dipping (PEIXOTO et al., 2015).

Miguel et al. (2012) comparam a higienização dos tetos feita apenas com água à realizada por pré-dipping e à não realização de qualquer higienização, e demonstram a necessidade de realização do pré-dipping, levando em conta a diminuição, na produção, de micro-organismos após sua prática. Estes mesmos autores também evidenciam a indispensabilidade de uma limpeza correta das ordenhadeiras, considerando seu papel na disseminação da infecção.

Os desinfetantes mais comuns utilizados no pré-dipping, e que são mais comumente estudados, em suas diversas concentrações e tempos de exposição, são o iodo, cloro, clorexidine, amônia quaternária e ácido láctico. Essas substâncias são utilizadas com mais frequência graças à sensibilidade dos micro-organismos causadores de mastite (MEDEIROS et al, 2009; COUTINHO et al., 2012; MIGUEL et al. 2012; LOPES; LACERDA; RONDA, 2013).

As principais características que devem ter uma maior importância para a não disseminação das mastites são a melhoria da mão de obra, a manutenção, ou troca, dos equipamentos utilizados e a uniformidade nos lotes para a ordenha (COENTRÃO et al., 2008).

Entre os micro-organismos causadores desta enfermidade, estão os *Staphylococcus* spp. Essa bactéria Gram positiva é o principal agente encontrado nas glândulas infectadas, além de possuir certo risco à saúde humana, os estafilos ainda podem tornar esta doença crônica (BANDOCH; MELO, 2011).

A resistência dos *Staphylococcus* spp. deve sempre ser monitorada, principalmente levando-se em consideração que o uso indiscriminado de antimicrobianos contribui para

a seleção de cepas resistentes, dificultando o tratamento dos distúrbios animais (COSTA et al., 2013). Considerando os aspectos mencionados, destaca-se a necessidade de educar, informar e instruir os produtores, mostrando a importância de se exigir os exames sanitários do rebanho para evitar problemas com a saúde humana.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração mínima inibitória de desinfetantes sobre *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina, bem como avaliar o tempo de atuação de cada princípio ativo por inibição do crescimento microbiano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva advindas de casos de mastite bovina clínica e subclínica dos projetos: "Prevalência de mastite clínica e subclínica na região de Nova Tebas-PR (11167/2007)", "Dados epidemiológicos da mastite em Tuneiras do Oeste-PR (15453/2009)" e "Prevalência da mastite bovina e qualidade do leite na região Sudoeste do Paraná", projeto previamente desenvolvidos pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense. Todas estas estirpes fazem parte da bacterioteca implantada e mantida por este mesmo laboratório.

Para a análise microbiológica de sensibilidade aos desinfetantes, foram usados, isolados das três cepas, mantidos em Ágar base sangue, acrescido de 5 a 8% de sangue ovino desfibrinado, por 24 horas.

Para determinação da eficácia dos desinfetantes (iodo, clorexidine e hipoclorito de sódio), utilizados no pré e pós-dipping, foram realizadas diluições nas concentrações de iodo a 0,57%, clorexidine a 2% e hipoclorito de sódio a 2%, concentrações comumente encontradas para a comercialização.

Para a análise, foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas em solução salina estéril correspondendo ao tubo 0,5 da escala de McFarland.

A suspensão bacteriana, com cada princípio ativo a ser testado, foi constituída por 0,8 ml da solução desinfetante, diluída conforme já citado anteriormente, e 0,2 ml de leite estéril, como fonte de nutrientes para o desenvolvimento de micro-organismos. Posteriormente, foram adicionados a suspensão bacteriana entre 1,2 e 2 ml de cada desinfetante, e cronometrado os tempos de (15", 30", 60" e 120") de exposição para então realizar o repique em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), além do uso de um controle positivo da diluição, sem adição dos desinfetantes, e de um controle negativo, com a não adição da suspensão bacteriana (MEDEIROS et al., 2009).

Essa mistura foi incubada a 37°C durante 24 horas. Após isso, as amostras foram repicadas em meio sólidos de ágar

sangue para confirmação da presença ou ausência de micro-organismo testado frente aos diferentes anti-sépticos e tempo de exposição.

Para análise dos dados obtidos, estes foram tabulados para realização de análise estatística e para cálculo da redução da carga bacteriana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram uma redução da carga de micro-organismos com o uso de todos os desinfetantes, porém o que maior apresentou eficiência *in vitro* foi a clorexidina 2%, seguido do hipoclorito de sódio 2% e iodo 0,57%. As amostras de *Staphylococcus aureus* (STAPHA – 18 amostras), *Staphylococcus* coagulase negativa (STACN – 65 amostras) e *Staphylococcus* coagulase positiva (STACP – 16 amostras) somadas tiveram maior redução da carga bacteriana frente ao iodo no tempo de 15”, em que 86% da carga bacteriana foi reduzida, contra 79,80%, 76,77% e 70,71% nos tempos de 30”, 60” e 120”, respectivamente, sendo os STACN as amostras com maior redução em todos os tempos testados. Frente ao hipoclorito de sódio houve uma redução parecida quando as amostras foram somadas nos quatro tempos testados, sendo reduções de 91,92%, 91,92%, 90,91% e 91,92%, em que novamente os STACN tiveram melhor resultado; já frente ao clorexidina, a redução foi de 95,96%, 98,99%, 98,99% e 97,98%, como visto na Figura 1, não havendo resultados discrepantes entre as cepas testada.

A saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada e os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha são fatores que afetam diretamente a contaminação microbiana do leite cru (GUERREIRO et al., 2005).

Ramalho et al., (2012) testaram a eficácia de desinfetantes normalmente utilizados no pré e pós dipping frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase positiva, e *Staphylococcus* coagulase negativa, e

demonstraram maior sensibilidade ao cloro, com concentração de 2,5% e ao clorexidina, com a concentração de 2%. Com este resultado, o presente trabalho pode deixar esclarecido que o cloro continua eficaz mesmo com a sua concentração reduzida a 2%, mostrando-se um sanitizante eficaz.

Medeiros et al (2009) obtiveram melhores resultados frente ao uso de iodo e de clorexidina, resultado também semelhante ao do presente trabalho.

Outro resultado semelhante também foi obtido por Coutinho et al (2012), que testaram os desinfetantes de pré e pós dipping. Para eles, o clorexidina também apresentou a melhor resposta frente a diferentes cepas isoladas.

Pedrini e Marghatto (2003) testaram, em diversas concentrações (2%, 1% e 0,5%), os desinfetantes que são comumente utilizados na desinfecção dos tetos frente a micro-organismos encontrados em amostras de leite bovino. Os testes *in vitro* mostraram maiores halos de ação, para diferentes concentrações, porém excluíram o uso de desinfetantes como o iodo a 2% e 1% e o hipoclorito de sódio a 2%, alegando que estas altas concentrações poderiam gerar resíduos no leite e lesões no teto, respectivamente. Eles indicam o uso do clorexidina a 0,5%, levando em consideração seu bom desempenho e custo benefício, concentração menor que a utilizada neste trabalho, comprovando a eficiência do clorexidina mesmo em baixas concentrações.

Lopes, Lacerda e Ronda (2013) mostraram que, para diferentes micro-organismos, iodo e clorexidina são os desinfetantes de escolha, dada a alta sensibilidade de diferentes cepas, incluindo cepas de *Staphylococcus* sp.

Silva e outros (2013) obtiveram resultados diferentes dos expostos no presente trabalho, evidenciando o iodo como melhor desinfetante, seguindo a tendência de outros trabalhos já discutidos.

Quando as medidas profiláticas não são o bastante, os antibióticos são a medida a ser tomada, Krewer e outros

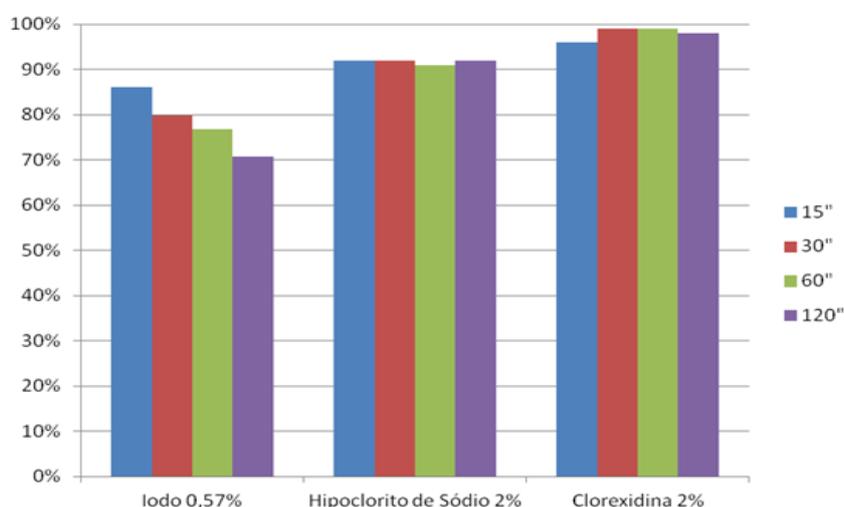


Figura 01. Redução da carga de bactéria *in vitro* após a utilização de desinfetantes - frente a cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina. Umuarama- PR, 2012.

(2014), mostram que os *Staphylococcus* spp. têm maior sensibilidade a gentamicina, enrofloxacin, cefalexina, ciprofloxacina e oxilicina.

CONCLUSÃO

A clorexidine 2% apresentou o melhor resultado frente os *Staphylococcus* spp., seguido do hipoclorito de sódio 2% e iodo 0,57%. Porém, deve-se realizar com frequência mais testes de perfil de sensibilidade e instruir os produtores para que não ocorra a seleção de cepas resistentes através do uso incorreto desses produtos.

REFERÊNCIAS

- BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. **Publicatio UEPG: Biological and Health Sciences**, Ponta Grossa, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011.
- COENTRÃO, C. M. et al. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 283-288, 2008.
- COUTINHO, L. C.A. et al. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 61-65, 2012.
- COSTA, E. O. da. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunicações científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 21-26, 1991.
- COSTA, G. M. da et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.
- DEMEU, F. A. et al. Influência do descarte involuntário de matrizes no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p.195-202, jan./fev., 2011.
- GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.
- KREWER, C. C. et al. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh v. 47, n. 3, p. 511-518, 2015.
- LOPES, L.; LACERDA, M.; RONDA, J. Eficiência de desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastites. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2013.
- MEDEIROS, E. S. et al. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, Jan. 2009.
- MIGUEL, P. R. R., et al. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012.
- PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microorganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.
- PEIXOTO, M. M. R., et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 105-109, 2015.
- RAMALHO, A. C. et al. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.
- SILVA, D. R. da, et al. Redução da carga bacteriana total após utilização de desinfetantes em ordenha mecânica no hospital veterinário da UNIPAR em diferentes períodos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16, p.2975-2983, 2013.
- TOZZETTI, D. S. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas—revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Garça, v. 6, n. 10, 2008.