

Avaliação *in vitro* da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais

In vitro evaluation of the sensitivity of strains of **Staphylococcus** spp. isolated from goat mastitis against commercial disinfectants

Layze Cilmara Alves da Silva^{1*}, Danielle Aluska do Nascimento Pessoa¹, Leomyr Sângelo Alves da Silva², Sílvia Sousa Aquino¹, Meire Maria da Silva Macêdo¹, Rodrigo Antonio Torres Mattos¹, Felício Garino Júnior¹

RESUMO: O uso de desinfetantes na profilaxia da mastite é uma prática adotada no seu programa de controle. A utilização da antissepsia dos tetos pós ordenha (*post-dipping*) tem demonstrado a redução dos índices de infecções intramamárias, reduzindo a colonização por micro-organismos na pele dos tetos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a sensibilidade de 101 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina frente a quatro desinfetantes: iodo 2; 1 e 0,5%; hipoclorito de sódio 2,5; 1,25 e 0,62%; clorexidina 2,0; 1,0 e 0,5% e quaternário de amônia 0,68; 0,34 e 0,17%. Verificaram-se que todas as concentrações utilizadas dos desinfetantes mostraram-se eficazes para completa eliminação do agente nos tempos de 30 e 60 minutos. Observaram-se as seguintes porcentagens de resistência aos desinfetantes: 15,8% ao iodo na concentração 0,5%; 10,8% ao hipoclorito de sódio (0,62%) e 7,9% ao quaternário de amônio (0,17%). A clorexidina demonstrou *in vitro* 100% de eliminação das estirpes de estafilococos em todos os tempos e concentrações testadas, portanto, por apresentar amplo espectro de ação sem provocar irritação na pele dos animais e por ser de baixo custo, torna-se um produto de uso economicamente viável para utilização em programas de controle de mastites caprinas.

PALAVRAS- CHAVE: mastite; cabras; resistência; ordenha.

ABSTRACT: The use of disinfectants in the prophylaxis of mastitis is a practice adopted in its control program. The use of post milking teat antiseptics (*post-dipping*) has been shown to reduce the rates of mammary infections by reducing the colonization by microorganisms on the skin of the teats. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of 101 strains of *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis against four disinfectants: iodine 2, 1 and 0.5%, sodium hypochlorite 2.5, 1.25 and 0.62%, chlorhexidine 2.0, 1.0 and 0.5% and quaternary ammonia 0.68, 0.34 and 0.17%. It was found that all concentrations of disinfectants were effective for complete removal of the agent at the times of 30 and 60 minutes. We observed the following percentages of resistance to disinfectants: 15.8% to iodine in a 0.5% concentration; 10.8% to sodium hypochlorite (0.62%) and 7.9% to the quaternary ammonium (0.17%). Chlorhexidine has demonstrated to eliminate 100% of the strains of staphylococci *in vitro*, at all times and concentrations tested, showing a broad spectrum of action without causing irritation to the skin of animals. As it provides a low cost disinfection, it becomes an economically viable product to be used in the goat mastitis control program.

KEYWORDS: mastitis; goats; resistance; milking.

¹Laboratório de Microbiologia; Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária; Centro de Saúde e Tecnologia Rural; Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Patos (PB), Brasil.

²Centro de Educação e Saúde; UFCG – Cuité (PB), Brasil.

*Autor correspondente: layze.cilmara@gmail.com

Recebido em: 10/04/2013. Aceito em: 05/10/2014.

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo, indicado inclusive para indivíduos que sofrem de problemas digestivos e que não toleram o leite bovino. Com o aprimoramento da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem surgido uma maior preocupação com a qualidade do leite, o que requer o controle de alguns fatores que possam alterar suas características, sendo o principal deles a mastite (LANGONI *et al.*, 2006).

A mastite, ou processo inflamatório da glândula mamária, caracteriza-se por determinar queda na produção e alterações na composição do leite (PEDRINI; MARGATHO, 2003). Na região Nordeste, sinais clínicos dessa enfermidade foram relatados em 51,2% dos rebanhos (PINHEIRO *et al.*, 2000).

Diversos micro-organismos têm sido associados à ocorrência de mastite em caprinos. Uma atribuição comum entre eles consiste na habilidade de todos colonizarem o canal do teto, local por onde se tem acesso à glândula mamária do animal infectado (SHEARER; HARRIS JUNIOR, 2003).

Cuidados na produção do leite devem ser tomados para garantir um produto com qualidade e em quantidade satisfatória, para isso, deve-se tomar o máximo cuidado no pré e pós-*dipping* (pós-ordenha). A desinfecção é um dos mais importantes aspectos de prevenção de enfermidades e nesse contexto muitos desinfetantes foram desenvolvidos especificamente para a prevenção das doenças nos rebanhos leiteiros (BODDIE *et al.*, 1997).

De acordo com FREITAS (1988), a imersão dos tetos em soluções antissépticas adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para redução da mastite contagiosa, podendo ser reduzidos os casos de mastite subclínica em até 85%.

Os princípios ativos mais utilizados para antisepsia dos tetos são iodo, clorexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Com objetivo de minimizar a irritação e condicionar a pele dos tetos são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses germicidas, como glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (SANTOS; FONSECA, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina frente a quatro desinfetantes: iodo, hipoclorito de sódio, clorexidina e quaternário de amônia.

Para realização da pesquisa foram utilizadas 101 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 24 de *S. simulans*, 20 de *S. chromogenes*, 15 de *S. epidermidis*, 10 de *S. caprae*, 7 de *S. aureus*, 7 de *S. xylosum*, 5 de *S. lugdunensis*, 5 de *S. hominis*, 3 de *S. saccharolyticus*, 2 de *S. lutrae*, 2 de *S. hycus* e 1 de *S. capitis*, isolados de casos de mastite caprina, procedentes da coleção de micro-organismos do

Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba.

A determinação da eficácia dos desinfetantes utilizados para controle da mastite foi realizada utilizando-se os seguintes princípios ativos: iodo (2; 1 e 0,5%), hipoclorito de sódio (2,5; 1,25 e 0,62%), quaternário de amônia (0,68; 0,34 e 0,17%) e clorexidina (2,0; 1,0 e 0,5%). Todos os desinfetantes foram testados nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos.

Foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas em solução salina estéril correspondendo ao tubo 0,5 da escala de McFarland.

A suspensão inicialmente foi constituída pela solução desinfetante (1 mL), em seguida, adicionou-se a suspensão bacteriana (100 mL) e cronometrou-se os tempos (5, 15, 30 e 60 minutos) de exposição do inóculo ao desinfetante, com posterior realização do repique em caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubação a 37 °C durante 24 horas para observação da turvação do meio, formação de película na superfície ou precipitado no fundo dos tubos. Em seguida, a suspensão foi repicada em meio sólido ágar sangue e incubada a 37 °C por 24 horas, com a finalidade de confirmar a presença ou ausência do micro-organismo na solução (COSTA *et al.*, 1998). Para o teste de controle de qualidade foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A diferença entre as eficácias dos desinfetantes frente os estafilococos testados foram analisadas estaticamente pelo teste não-paramétrico de U de Mann-Whitney, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal frente o teste de Shapiro Wilk. A comparação das diferentes concentrações dos desinfetantes para eliminação dessas estirpes foi feita por meio da análise de variância (ANOVA) (ZAR, 1999). A realização desses testes se deu mediante auxílio do programa R 3.0.3 com nível de significância $p < 0,05$. Para verificação de diferenças entre a eficácia dos desinfetantes em relação a cada espécie de estafilococos analisada foi realizada a análise multivariada Permanova, sendo considerado para a sua significância $p < 0,05$. Esse teste foi efetivado por meio da utilização do programa Prime + Permanova 6.0.

A clorexidina demonstrou 100% de eficácia na eliminação de todas as estirpes de estafilococos analisadas em todas as concentrações e tempos testados, corroborando os achados de MEDEIROS *et al.* (2009), que obtiveram resultados semelhantes em trabalho realizado com 60 amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite bovina, sendo que 100% das amostras foram sensíveis a clorexidina 2,0%. BLOWEY; EDMONDSON (2010) citaram que a clorexidina deve ser utilizada na concentração de 0,4 a 0,8%, auxiliando principalmente o combate das infecções estafilocócicas em cabras, sendo menos afetada pela matéria orgânica do que a maioria dos outros desinfetantes.

Verificaram-se que todas as concentrações utilizadas dos desinfetantes mostraram-se eficientes para eliminação completa de *Staphylococcus* spp. nos tempos de 30 e 60 minutos. Resultados satisfatórios, tendo em vista que, segundo BLOWEY; EDMONDSON (2010), o tempo preconizado para ação do desinfetante no pós-dipping é de 1 a 2 horas.

As estirpes de estafilococos no tempo de 5 minutos apresentaram maior grau de resistência (15,8%) ao iodo na concentração 0,5%, seguido de (10,8%) ao hipoclorito de sódio 0,62% e (7,9%) ao quaternário de amônio na concentração 0,17%. A maior resistência observada no tempo de 15 minutos (7,9%) foi observada ao quaternário de amônio 0,17% (Tabela 1).

Não houve diferenças estatísticas significantes entre a eficácia dos desinfetantes em relação a cada espécie de estafilococos analisada ($p > 0,05$), diferindo dos achados de MEDEIROS *et al.* (2009), que citaram uma maior atividade do iodo e da clorexidina frente ao *Staphylococcus aureus* isolado de mastites bovinas.

A clorexidina e o iodo diferiram significativamente entre si quanto à comparação de sua atividade na eliminação de todos os estafilococos ($p = 0,03$), contrastando com os resultados encontrados por SILVA *et al.* (2000), que realizaram estudo comparando a ação de soluções antissépticas de clorexidina e iodo na eliminação de bactérias no pré-operatório na pele de cães e não verificaram diferença significativa entre estes dois desinfetantes. Já a comparação da eficácia entre clorexidina e hipoclorito de sódio e clorexidina e quaternário de amônia no combate a esses agentes patogênicos não demonstrou diferenças significativas ($p > 0,05$).

A concentração do iodo que demonstrou maior eliminação (100%) dos inóculos analisados mediante todos os tempos testados foi a 2%, no entanto, JONES (1998) relatou que soluções de iodo devem ser utilizadas em imersão dos tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), uma vez que soluções a 1% de iodo podem deixar resíduos no leite, além de causar desvantagens como irritação da pele e elevada afinidade por matéria orgânica, fazendo com que seu potencial oxidante e, conseqüentemente, seu poder germicida seja reduzido nesses casos.

O hipoclorito de sódio a 2,5% mostrou 100% de desempenho frente aos micro-organismos testados, semelhante ao observado por PEDRINI; MARGATHO (2003) sobre 34 culturas puras de *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. isoladas de casos de mastite clínica em bovinos. COSTA *et al.* (1998), em estudo sobre a atividade do cloro frente a amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina, verificaram resistência *in vitro* a esse desinfetante e ressaltaram a importância do seu uso adequado, uma vez que a presença de matéria orgânica determinou uma diminuição acentuada na sua eficácia.

A análise das diferentes concentrações de cada desinfetante em relação a sua ação na eliminação das estirpes utilizadas no presente estudo, em cada tempo testado, não demonstrou diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$). Entretanto, evidencia-se que o uso de soluções antissépticas em menores concentrações, além de diminuir possíveis efeitos residuais na pele e leite, reduzem custos (PHILLIPS *et al.*, 1991).

No Brasil, estudos referentes à eficácia do uso de desinfetantes na pós-ordenha para redução de micro-organismos causadores de mastite em rebanhos caprinos ainda são escassos. Porém, em pequenos ruminantes tem sido constatado o uso da antisepsia da teta após a ordenha, principalmente em rebanhos altamente infectados (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; CONTRERAS *et al.*, 2003), revelando-a como método muito eficaz para prevenir a mastite nesses animais (CONTRERAS *et al.*, 2003).

Com base nos resultados obtidos, concluíram-se que todos os desinfetantes testados apresentaram 100% de eficácia *in vitro* para eliminação das estirpes de *Staphylococcus* spp., frente os tempos de 30 e 60 minutos. A clorexidina demonstrou 100% de eficácia *in vitro* na eliminação desses agentes em todos os tempos e concentrações testadas. Esta, por ser um antisséptico de efeito antibacteriano cumulativo e contínuo, apresentando amplo espectro de ação sem provocar irritação e ser de baixo custo, torna-se um produto de uso economicamente viável para utilização em programas de controle de mastites caprinas.

Tabela 1. Perfil de resistência *in vitro* de 101 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite caprina, aos desinfetantes iodo, clorexidina, hipoclorito de sódio e quaternário de amônia, avaliados nos tempos de 5 e 15 minutos.

Concentração	Desinfetantes											
	Iodo			Clorexidina			Hipoclorito de sódio			Quaternário de amônia		
Concentração (%)	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	0,50	2,50	1,25	0,62	0,68	0,34	0,17
Resistência em 5 minutos (%)	0,9	4,9	15,8	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	10,8	0,0	0,9	7,9
Resistência em 15 minutos (%)	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,9	7,9

REFERÊNCIAS

- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, v.79, n.1, p.1-16, 2003.
- BLOWEY, R.W.; EDMONDSON, P. Teat Disinfection. 2nd ed. In: BLOWEY, R.W.; EDMONDSON, P. (Eds.). *Mastitis Control in Dairy Herds*. Washington: CAB International, 2010. p.152-170.
- BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.11, p.2809-2814, 1997.
- CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science*, v.79, n.2-3, p.273-283, 2003.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; GARINO JÚNIOR, R., F.; SILVA, J.A.B.; THIERS, F.O. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós-ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina. *Napagama*, v.1, n.1, p.18-22, 1998.
- FREITAS, M.A.Q. Mastite bovina: importância e controle. *Circular Técnico PESAGRO-RIO*, n.11, p.14, 1988.
- JONES, G.M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. *Dairy Science*, p.404-227, 1998.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.13, n.1, p.51-54, 2006.
- MEDEIROS, E.S.; SANTOS, M.V.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; FARIA, E.B.; WANDERLEY, G.G.; TELLES, J.A.A.; MOTA, R.A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.1, p.71-75, 2009.
- PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, n.4, p.391-395, 2003.
- PHILLIPS, M.F.; VASSEUR, P.B.; GREGORY, C.R. Chlorhexidine diacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: a prospective randomized comparison in dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.27, p.105-108, 1991.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.5, p.534-543, 2000.
- SANTOS M.V.; FONSECA L.F.L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite. Editora Manole, Barueri, p.314, 2006.
- SHEARER, J.K.; HARRIS JUNIOR, B. Mastitis in dairy goats. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2003. Disponível em: <<http://www.georgiagoat.com/articles/Mastitis.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2012.
- SILVA, D.A.R.; COSTA, M.M; VARGAS, A.C.; ALIEVI, M.M.; SCHOSSLER, J.E.W.; SILVA, T.R. O gluconato de clorexidina ou o álcool-iodo-álcool na anti-sepsia de campos operatórios em cães. *Ciência Rural*, v.30, n.3, p.431-437, 2000.
- ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 4a ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 929p.