

SENSIBILIDADE DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA EM BOVINOS FRENTE A DIFERENTES TIPOS DE DESINFETANTES

S.C.B. Pedrini & L.F.F. Margatho

¹Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) de Bauru, Pólo Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Oeste, APTA, Av. Rodrigues Alves, 40-40, CEP 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil. E-mail: ibbauru@ig.com.br

RESUMO

O controle da mastite bovina é essencial para a produção de leite de boa qualidade. A antissepsia dos tetos por meio de banhos de imersão com desinfetantes adequados pode reduzir novas infecções em 50 a 90%. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* de diluições sucessivas de diferentes agentes desinfetantes no combate a microrganismos causadores de mastites contagiosa e ambiental. Foram comparadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC com amostras de *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp. e *Escherichia coli* isoladas de casos de mastite bovina clínica. Este estudo demonstrou que as soluções de iodo a 2% e a 1% apresentaram o melhor desempenho *in vitro* contra todos os microrganismos testados, mas utilizado nessas concentrações o iodo pode deixar resíduos no leite. O hipoclorito de sódio a 0,5% não foi efetivo. O cloreto de benzalcônio a 1% apresentou-se ativo apenas contra agentes gram positivos. O clorexidina obteve papel de destaque, tendo demonstrado efetivo contra microrganismos causadores de mastites contagiosa e ambiental, podendo ser utilizado na concentração de 0,5%.

PALAVRAS-CHAVE: Mastites, gado leiteiro, clorexidina, iodo, amônia quaternária, hipoclorito de sódio.

ABSTRACT

SUSCEPTIBILITY OF PATHOGENIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM CLINIC BOVINE MASTITIS CASES TO DIFFERENT KINDS OF DISINFECTING AGENTS. The control of bovine mastitis is extremely necessary in order to obtain a high-quality milk production. Pre-and post-milking teat dips with an appropriate disinfecting agent have reduced new udder infections by 50 to 90%. The aim of this work was to compare microorganisms isolated from bovine mastitis cases to establish their susceptibility to successive dilutions of different kinds of disinfecting agents. In this study *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, and ATCC standard stains of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* were used. This study proved that iodine tincture at 2% and 1% presented the best performance *in vitro* against all evaluated microorganisms. But if iodine teat dips are used, low iodine concentrations (0.5% or less) should be used since 1% iodine has resulted in a mild increase in milk iodine content. Sodium hypochlorite at 0.5% was ineffective. Benzalkonium chlorite at 1% was only effective against gram-positive agents. Chlorhexidine was outstanding, because it was effective against both environmental and contagious mastitis agents. Chlorhexidine can be used at 0.5%.

KEY WORDS: Mastitis, dairy cows, chlorhexidine, iodine, quaternary ammonium, sodium hypochlorite.

INTRODUÇÃO

A mastite, ou processo inflamatório da glândula mamária, caracteriza-se por determinar queda na produção e alterações na composição do leite. Normalmente, resulta da ação de agentes infecciosos, podendo estar envolvidas diferentes espécies de vírus, fungos, micoplasmas e, principalmente, bactérias.

Epidemiologicamente, a mastite bovina divide-se em mastite contagiosa e ambiental. A mastite contagiosa é definida pela forma de transmissão de animal para animal, possui como reservatório o próprio animal e sua localização é intramamária. Os patógenos predominantes nas infecções são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, seguidos pelo *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* sp. A

mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do reservatório do patógeno estar localizado no próprio ambiente das vacas leiteiras, sendo os patógenos primários mais frequentes bactérias gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. (MARGATHO *et al.*, 1998). De acordo com a forma de manifestação da infecção, as mastites podem ser caracterizadas como clínicas ou subclínicas, sendo esta a forma mais prevalente da doença e a causadora da maioria das perdas econômicas, que variam de 5 a 25% da produção leiteira.

O desenvolvimento de um programa efetivo de controle da mastite no rebanho implica em algumas medidas importantes, como o tratamento das vacas no período seco, tratamento dos casos clínicos, manejo adequado e bom funcionamento do sistema de ordenha. Para produção de leite com qualidade e quantidade é indispensável um úbere saudável e, para isto, deve-se tomar o máximo cuidado no pré e pós-dipping. Mergulhar os tetos, cobrindo-os por inteiro acima da base do úbere com soluções antissépticas adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para redução da mastite contagiosa e, segundo FREITAS (1988) e SILVA (1977), respectivamente, podem reduzir a mastite subclínica em até 85% ou 90% conforme JONES (1998), para o qual o pré-dipping reduz novos casos de mastites causadas por coliformes e estreptococos ambientais. Para GOLDBERG *et al.* (1994) ocorre uma melhora na condição de pele do teto e, assim, reduz-se as taxas de infecção da glândula mamária no rebanho. BRITO (2000) relata uma redução do número de bactérias na pele dos tetos em mais de 90% após mamada do bezerro, se os tetos forem cuidadosamente higienizados.

Infelizmente, na maioria das propriedades, agentes desinfetantes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço. Entretanto, deve-se avaliar as praticidades e as limitações de cada desinfetante, dado que o uso inadequado de desinfetantes ou baixas concentrações de químicos antimicrobianos levam a uma seleção natural de cepas resistentes em uma população microbiana. Assim, o uso apropriado de agentes desinfetantes tem como objetivo reduzir suficientemente a população de microrganismos patogênicos e evitar o potencial espalhamento de enfermidades. Como não existe um agente desinfetante ideal, deve-se ter em mente algumas considerações para a escolha do desinfetante apropriado, tais como possuir amplo espectro de ação; ser atóxico e não irritante aos tecidos humano e animal; apresentar estabilidade na pele e ter custo acessível.

Dos métodos microbiológicos mais conhecidos para avaliar a ação de um desinfetante temos: o coeficiente fenólico, o de suspensão qualitativa; o de

suspensão quantitativa; o de diluição-uso; o de fricção; o de lavagem ou contato com ágar e o de difusão em gel de ágar, usados para demonstrar a extensão da destruição microbiana em superfícies, utensílios e equipamentos (HOFFMAN *et al.*, 1995).

Este trabalho teve como objetivo demonstrar o desempenho *in vitro*, pela técnica de difusão em ágar gel, de alguns desinfetantes comerciais, diluídos sucessivamente, frente a microrganismos patogênicos causadores de mastites contagiosa e ambiental, isolados de casos de mastites clínicas em bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desinfetantes

Foram utilizados quatro princípios ativos distintos de desinfetantes comerciais comuns, sob a forma de diluições seriadas. São eles: tintura de iodo a 2%, 1% e 0,5%; hipoclorito de sódio a 2%, 1% e 0,5%; digluconato de clorexidina a 2%, 1% e 0,5% e um composto de amônia quaternária, o cloreto de benzalcônio, a 1%, 0,5% e 0,25%.

Microrganismos

Durante a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, foram utilizadas 34 culturas puras de diferentes cepas selvagens isoladas de casos de mastite clínica em bovinos, sendo 41,2% *Staphylococcus* sp.; 38,2% *Escherichia coli*; 8,2% *Streptococcus* sp. e 5,9% *Corynebacterium* sp. Estas cepas de campo tiveram sua sensibilidade comparada com cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

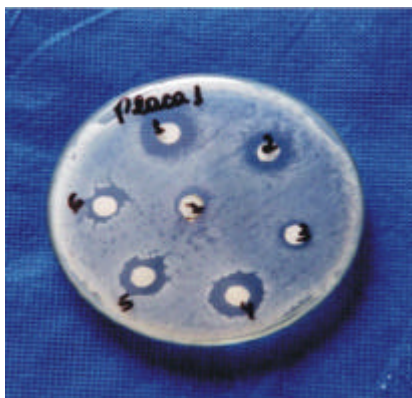
Teste de difusão em gel de ágar

Cultivo dos microrganismos

As bactérias, previamente isoladas de leite mastítico e estocadas em Ágar Nutriente, foram reativadas em "Brain Heart Infusion" (BHI) em tubos de ensaio e incubadas a 37° C durante 24 horas.

Padronização e inoculação dos microrganismos

Após incubação, as culturas em BHI foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 15 minutos, ressuspensas em água destilada e, sua concentração, ajustada conforme a escala 0,5 de MacFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Só então as suspensões foram inoculadas, por meio de swabs estéreis, na superfície do meio de cultura respectivo para cada tipo de microrganismo: Ágar Nutriente (AN) para mesófilos e MacConkey (MC) para *Escherichia coli*.



Os maiores halos de inibição foram dados pela solução de iodo a 2%, mas a solução a 1% não diferiu estatisticamente da solução a 2% ($p > 0,001$). Estudos relatam que soluções de iodo devem ser utilizadas em banhos de tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), desde que soluções a 1% de iodo têm resultado em aumento no teor de iodo no leite (JONES, 1998).

Tabela 1 - Valores médios da medida (em milímetros), do halo de inibição do crescimento bacteriano por diluições sucessivas de diferentes desinfetantes.

[illegible]

PHILLIPS *et al.* (1991) realizaram estudos comparando soluções antissépticas de clorexidina e iodo para o pré-operatório na pele de cães, e não verificaram diferença significativa entre estes dois princípios desinfetantes em 200 animais testados. Nosso estudo revelou que o clorexidina apresenta eficácia contra ambos microrganismos causadores de mastites contagiosa e ambiental. Sua ação foi maior quanto maior a concentração, mas as soluções a 2% e a 1% não se distinguiram daquela a 0,5%. Entretanto, foram significativamente superiores à ação do hipoclorito de sódio a 0,5% ($p < 0,0001$), o que implica em grande vantagem econômica em se utilizar o diacetato de clorexidina a 0,5%, ao invés do hipoclorito de sódio a 0,5%.

O clorexidina é bastante empregado para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas, devido ao seu efeito antibacteriano cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por 6 horas (SPINOSA *et al.*, 2002). BILL (1997) estima sua ação residual em mais de 24 horas. Além disso, retém atividade na presença de material orgânico, é de fácil aplicação e econômico. Em comparação com soluções de iodo, o clorexidina causa menor reação tecidual ou de pele nas diluições recomendadas (PHILLIPS *et al.*, 1991).

O digluconato de clorexidina é indicado como terapia tópica para tratamento de dermatites fúngicas e piodermatites em cães e gatos. O gluconato de clorhexedina a 0,12% tem sido amplamente empregado em odontologia, como auxiliar no tratamento de gengivites e na prevenção de doenças periodontais. MARQUES (1997) demonstrou a eficácia de diferentes concentrações de soluções à base de clorexidina, por meio do teste de difusão em ágar, sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans*, mas não agiu contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que a solução de clorhexedina a 1% foi mais eficaz que a mesma solução a 0,5% e a 0,12%, variando de acordo com fatores como concentração e tempo de contato. ESTRELA (2000), obteve a Concentração Inibitória Mínima (MIC) para *S. aureus* igual a 0,000002% do digluconato de clorexidina a 2%.

A solução de hipoclorito de sódio a 2% mostrou excelente eficácia contra todos os microrganismos testados ($p = 0,0122$), mas nessa concentração é extremamente irritante para a pele do animal. Este estudo comprova que o hipoclorito de sódio a 0,5%, concentração recomendada para rotina, tem efeito antimicrobiano bastante reduzido ($p = 0,0119$). Além do que, o cloro apresenta um elevado grau de afinidade por material orgânico como fezes, sangue, pus, o que pode neutralizar a sua ação microbicida na prática rotineira do pré e pós-dipping (BILL, 1997).

O cloreto de benzalcônio a 1% apresentou-se mais eficiente contra bactérias do gênero *Streptococcus* e *Corynebacterium* sp. Teve ação menor para

Staphylococcus sp. e *Staphylococcus* ATCC. Esta solução não apresentou bom desempenho para gram negativos, e, embora o cloreto de benzalcônio a 1% tenha apresentado o maior halo de inibição para o *Corynebacterium* sp., não houve diferença estatística quanto à sensibilidade deste gênero aos diferentes desinfetantes ($p = 0,4568$). Estes resultados discordam de STEWART & PHILPOT (1982), que indicam seu uso a 0,5%, pois em nosso trabalho este composto de amônia quaternária agiu melhor na concentração de 1%.

Em geral, as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC e *Staphylococcus aureus* ATCC apresentaram halos de inibição maiores que as cepas de campo, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO

O hipoclorito de sódio a 2% apresentou bom desempenho contra os microrganismos testados, mas nesta concentração é muito irritante para a pele do teto; e a 0,5%, como é utilizado comercialmente, foi pouco efetivo. O cloreto de benzalcônio a 1% exerceu melhor sua ação no caso de mastites contagiosas que ambientais. Nosso estudo demonstrou que as soluções de iodo a 2% e 1% foram as mais efetivas *in vitro*. Entretanto, para imersão dos tetos, recomenda-se a utilização do iodo a 0,5% a fim de se evitar resíduo no leite. Já o clorexidina apresentou boa efetividade contra gram positivos e negativos, tanto a 1% quanto a 0,5%, o que torna o produto economicamente viável quando se analisa a relação custo x benefício, pois, além de ser um agente antisséptico de amplo espectro de ação e não irritante, apresenta um efeito antibacteriano cumulativo e contínuo, podendo ser utilizado com segurança para o controle de mastites contagiosa e ambiental em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILL, R.L. *Pharmacology for veterinary technicians*. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1997. p.240-243.
- BRITO, J.R.F. Contagem bacteriana da superfície de tetos de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Rev. Univ. Fed. Santa Maria*, v.30, n.5, 2000.
- ESTRELA, C.R.A. *Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares*. Goiânia: 2000. 38p. [Dissertação (Mestrado) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Univ. Fed. de Goiás].
- FREITAS, M.A.Q. *Mastite bovina: importância e controle*. *Circular Téc. Pesagroria*, n.11, p.14, 1988.
- GOLDBERG, J.J.; MURDOUGH, P.A.; HOWARD, A.B.; DRECHSLER, P.A. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. *J. Dairy Sci.*, v.77, n.33, p.740-747, 1994.

- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 12.ed. Piracicaba: 1987. p.298.
- HOFFMAN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. *Higiene Alimentar*, v.9, n.39, p.29-34, 1995.
- JONES, G.M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. *Dairy Science*, Virginia Cooperative Extension, p.404-227, 1998.
- MARGATHO, L.F.F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C.N. *Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina*. *Bol. Téc. Inst. Biol.*, São Paulo, n.9, p.5-35, 1938.
- MARQUES, A.M.C. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de clorexidina em diferentes concentrações sobre microrganismos freqüentemente encontrados no canal radicular. Estudo *in vitro*. Salvador: 1997. 101p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Univ. Fed. da Bahia].
- 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. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.27, p.105-108, 1991.
- SILVA, N. *Mastite bovina no rebanho leiteiro da Escola Média de Agricultura Florestal – UFV*. Minas Gerais: 1977. 81p. [Dissertação (Mestrado) – Univ. Fed. de Minas Gerais].
- SPINOSA, H.S.; GORNÍAK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p. 389-394.
- STEWART, G.A.; PHILPOT, W.W. Efficiency of a quaternary ammonium teat dip for preventive intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v.65, p.878-880, 1982.
- Recebido em 5/8/03
Aceito em 1/10/03