

REDUÇÃO DA PRESENÇA DE *Staphylococcus aureus* COM O USO DE DIFERENTES ANTISSEPTICOS EM REBANHO LEITEIRO.

Maíra Lais Santana Rizzotto ✉

Djuli Milene Hermes

Crislaine Aparecida Paludo

Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, RS.

✉ mailairizzo@gmail.com

RESUMO

A mastite está entre as principais enfermidades na pecuária leiteira, é considerada endêmica e onerosa para os produtores leiteiros e indústrias de laticínios. O *Staphylococcus aureus* está envolvido na maioria dos casos de mastite bovina, sendo disseminado de forma contagiosa. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do pré *dipping*, utilizando três princípios ativos comerciais para redução bacteriana do *S. aureus*, isolados do leite *in natura*, provenientes de um rebanho leiteiro localizado na região nordeste do município de Garibaldi, RS. Foram avaliadas 36 fêmeas bovinas e três antissépticos (iodo, clorexidina e ácido láctico). Após a higienização, de acordo com cada experimento, foram desprezados os três primeiros jatos sendo colhidos 30 mL de leite em frascos estéreis, totalizando 144 amostras *in natura*, semeadas em placas de Ágar Baird Parker e procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). As análises foram realizadas durante o

mês de outubro de 2016. Foi evidente a redução microbiana das estirpes de *S. aureus* com o uso dos antissépticos, no entanto não foi suficiente para verificar uma ação bactericida. Os resultados mostraram redução significativa do crescimento do *S. aureus* nas amostras analisadas, a maior efetividade na redução foi verificada com o uso do iodo com 66,67%, seguido de 37,50% de redução com o uso da clorexidina e 29,17% de redução com o uso do ácido láctico. A partir destes dados, conclui-se que a aplicação dos antissépticos utilizados é uma prática fundamental para reduzir a contaminação de patógenos nos tetos das bovinas, sendo medidas higienicossanitárias efetivas para garantir a segurança do leite *in natura*.

Palavras-chave: Antissepsia.

Mastite. Pré *dipping*.

Staphylococcus aureus.

ABSTRACT

Mastitis is among the main diseases in dairy farming, it is considered endemic and expensive for the dairy producers and industries. The

bacterium Staphylococcus aureus is involved in the majority of the cases of bovine mastitis, being spread contagiously. In this regard, the present study aims to evaluate the efficiency of pre-dipping, using three commercial active principles for bacterial reduction of Staphylococcus aureus; isolated from milk in natura, proceeding from a dairy herd in the northeast region of the city of Garibaldi, RS. 36 female bovines and three antiseptics were evaluated (iodine, chlorhexidine and lactic acid). After the hygienic cleaning in accordance with each trial, the first three shots of milk were rejected and 1.01 fl oz of milk was harvested in sterile bottles, making a total of 144 samples in natura cultured in plates of Baird Parker Agar. Afterwards, the number of Colony Forming Units (CFU/fl oz) was counted. The analyses had been carried through during the month of October of 2016. The microbial reduction of the strains of S. aureus was evident with the use of antiseptics, however, it was not enough to verify a bactericidal effect. The results have shown significant reduction of the growth of S. aureus in the

analyzed samples, the biggest effect in the reduction was verified with the use of iodine, 66.67%, followed by 37, 50% of reduction with the use of chlorhexidine and 29.17% of reduction with the use of lactic acid. From these data, we are able to conclude that the use of these tested antiseptics is essential to reduce the contamination of pathogens on the teats of the bovine. These are hygienical-sanitary measures effective to guarantee the aptness of milk in natura.

Keywords: Antisepsis. Mastitis. Pre dipping. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A mastite é caracterizada por um processo inflamatório na glândula mamária, causado por diversos micro-organismos, cerca de 90% dos casos são causados por bactérias. A mastite é considerada o principal problema para os bovinocultores, pois causa graves impactos e inúmeros prejuízos, como a queda na produção do leite, sendo responsável por 38% de morbidade em vacas leiteiras adultas (TOZZETTI et al., 2008; PERES NETO; ZAPPA, 2011).

Segundo Massei et al. (2008), não são apenas as perdas econômicas diretas os principais problemas da atividade leiteira; deve-se levar em conta também as perdas indiretas, que são um conjunto de fatores prejudiciais, difíceis de quantificar, que incluem gastos com tratamentos farmacológicos, alterações organolépticas no leite e descarte precoce dos animais.

Para reduzir os impactos econômicos causados pela mastite clínica e subclínica é necessário o monitoramento em conjunto com a adoção de medidas preventivas. As despesas com tratamento preventivo representam 11,7% do impacto econômico, sendo benéfico o investimento para

os bovinocultores, pois essas práticas irão contribuir significativamente para redução do impacto econômico da mastite (DEMEU et al., 2015).

A importância de estabelecer programas sanitários e prevenir a formação de biofilmes deste patógeno, são imprescindíveis para a diminuição das fontes de contaminação da glândula mamária nos diferentes sistemas de produção leiteira (PEIXOTO et al., 2015).

O tempo prolongado de infecção causado por este agente patogênico pode levar à cronicidade da doença, afetando diretamente o sistema imune do animal, constituindo-se em uma das mais graves patologias no mercado leiteiro, podendo ocorrer surtos de intoxicação alimentar, que são transmitidos aos alimentos por manipuladores contaminados, além de produzir exotoxinas que deterioram o leite (BANDOCH & MELO, 2011).

A saúde do rebanho depende do bem-estar dos animais. Para se ter vacas sadias e úberes saudáveis é fundamental ter higienização adequada, executar os procedimentos de imersão dos desinfetantes nos tetos de forma correta; o pré e pós *dipping* são práticas indispensáveis para se ter sucesso na redução da mastite contagiosa e podem reduzir a mastite subclínica em até 90% (PEDRINE; MARGATHO, 2014).

O uso de produtos de assepsia e o monitoramento periódico são práticas eficazes de controle e prevenção da mastite. É necessário, porém, a avaliação dos desinfetantes utilizados, pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. (MEDEIROS et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do pré *dipping* utilizando três princípios ativos comerciais para redução bacteriana do *Staphylococcus*

aureus, isolados do leite *in natura*, provenientes de um rebanho leiteiro na Serra Gaúcha.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em um rebanho leiteiro, no município de Garibaldi, no Estado do Rio Grande do Sul. Participaram da pesquisa 36 fêmeas bovinas, escolhidas de forma aleatória. A produção de leite realizava-se por ordenha mecânica, com estrutura de espinha de peixe bilateral e capacidade para ordenhar 8 vacas simultaneamente. O rebanho analisado era constituído por animais da raça Holandesa, em diferentes fases de lactação e mantidas sob o sistema de criação semi-intensivo.

Foram coletadas 144 amostras individualizadas de leite, diretamente dos tetos das 36 fêmeas bovinas, durante o mês de outubro de 2016, as coletas foram realizadas na última ordenha do dia. A antisepsia das mãos do ordenhador foram realizadas com água corrente e sabão, após enxugadas com papel toalha e finalizando com a aplicação de álcool 70 ° GL, sendo esta prática executada em todos os grupos. Após higienização, foram desprezados os três primeiros jatos e colhidos 30 mL de leite.

Todas as amostras foram devidamente identificadas, armazenadas em tubos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, RS.

As fêmeas foram divididas em três grupos: (I) iodo, (C) clorexidina e (ÁL) ácido láctico, contendo 12 animais cada, após foram subdivididas em dois grupos: teste e controle para comparar o antes e o depois do uso de cada antisséptico utilizado nos tetos das bovinas. A fim de verificar a eficácia dos antissépticos testados. Os tetos anterior direito e posterior esquerdo de cada vaca foram tratados

com antissépticos (grupo teste), e os tetos anterior esquerdo e posterior direito não receberam os tratamentos com os antissépticos (grupo controle). Todos os tetos foram lavados com água corrente, vinda de um poço artesiano onde o tratamento e controle da água são realizados periodicamente na propriedade.

Em cada experimento foram empregadas 12 fêmeas bovinas, perfazendo n=48 tetos, 24 tetos pertenciam ao grupo teste, os quais receberam o antisséptico conforme o grupo e os outros 24 pertenciam ao grupo controle, os quais foram lavados apenas com água corrente e enxugados com papel toalha. Totalizando, ao fim destes experimentos, 144 amostras dos três experimentos propostos: iodo, clorexidina e ácido láctico.

Os três antissépticos utilizados: iodo 0,5%, clorexidina 2,1% e ácido láctico 2,0%, foram adquiridos nas concentrações indicadas, não sendo necessário o preparo de diluições, como eram de uso comercial, estavam devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O método de aplicação foi por meio do uso de canecas de imersão, sem retorno dos antissépticos para evitar a contaminação da solução, aguardando um período de 15 segundos e após enxugados com papel toalha.

Para o isolamento de *Staphylococcus aureus* no leite *in natura* foram realizadas diluições em água peptonada tamponada estéril 10^{-1} , transferiu-se 0,1 mL de cada diluição para as placas de Petri contendo o meio Ágar *Baird Parker*, que é específico para o isolamento e contagem deste micro-organismo. O inóculo foi espalhado em toda superfície utilizando a técnica de semeadura *Spread plate* com o auxílio da alça de *Drigalsky*. Logo após, as placas foram incubadas a 35°C e realizou-se a leitura das

mesmas após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica. Para o critério de contagem, foram selecionadas placas que continham entre 20 e 200 colônias típicas, estas foram avaliadas conforme a morfologia (negras, circulares, convexas, halos transparentes) sendo submetidas a provas: produção de catalase, coagulase e coloração de Gram.

A metodologia utilizada para a pesquisa de *S. aureus* foi a Contagem Direta em Placas. Foram calculados o número de UFC/mL em função do número de colônias típicas contadas por placa, multiplicado pela diluição inoculada. A partir dos resultados obtidos, foram calculadas as frequências absoluta e relativa dos grupos teste e controle, conforme Sampaio (1998), posteriormente foram comparadas utilizando o teste do χ^2 de Pearson ou exato de Fisher, com o nível de significância a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 144 amostras de leite *in natura* colhidas, 100 (69,44%) apresentaram crescimento de colônias de *S. aureus*, entre estas amostras 15 (10%) foram enumeradas. Posteriormente, foram isoladas três cepas de cada amostra, sendo submetidas aos testes fenotípicos confirmando tratar-se da espécie *S. aureus*, 44 (30,56%) não apresentaram nenhum tipo de crescimento após a incubação a 35°C por 48 horas em estufa bacteriológica. As cepas isoladas foram submetidas a prova bioquímica da catalase, 100% apresentaram resultados positivos.

Diante disto, verificou-se que 10% das amostras analisadas apresentaram contagens entre 20 a 200 Unidades Formadoras de Colônias, sendo valores significativos para enumeração, dados estes similares aos achados de Lancette; Tatini

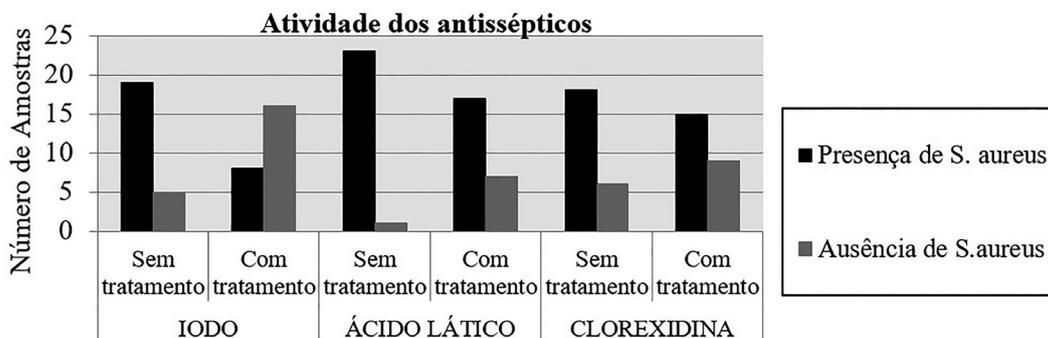
(2001). A contagem de *S. aureus* variou de $2,1 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^4$ UFC/mL.

Brites et al. (2013) concluíram que os surtos de intoxicação estafilocócicas e a quantidade de vacas com mastite são consequência das altas taxas de *S. aureus*, sugerindo a conscientização dos produtores para o monitoramento da saúde do rebanho e a execução das boas práticas na atividade leiteira levando à obtenção de matéria-prima com mais qualidade.

Os resultados do presente estudo demonstraram uma contagem reduzida de *S. aureus*, dados estes que estão de acordo com o mínimo tolerado pelos critérios da Instrução Normativa nº 62/2011, a qual estabelece o limite máximo de 1×10^5 UFC/mL de *S. aureus* pois, em concentrações maiores, pode ocorrer a produção de enterotoxinas que são termoestáveis, podendo causar danos à saúde do consumidor (CARMO et al., 2002). As amostras de leite *in natura* estavam nos padrões exigidos pela legislação, mostrando-se adequado para ser utilizado pelas indústrias de laticínios e a produção de derivados do leite.

Para ocorrer uma intoxicação alimentar e desencadear seus sintomas é necessário apresentar quantidades superiores a 10^5 e 10^6 UFC/g ou mL da bactéria pois, nestas condições, ocorre o favorecimento de produção das enterotoxinas nos alimentos (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

Das amostras analisadas frente ao antisséptico iodo a 0,5%, 66,67% (16/24) das amostras do grupo teste não apresentaram crescimento de *S. aureus* nas placas de *Baird Parker*, somente 33,33% (8/24) das amostras apresentaram o crescimento da bactéria. Já no grupo controle, onde foram lavados apenas com água corrente, foi evidente o aumento do *S. aureus* nas amostras analisadas, 79,17%

Figura1 - Resultados obtidos dos antissépticos no grupo teste e controle Garibaldi, RS.

(19/24) apresentaram crescimento e 20,83% (5/24) amostras não apresentaram crescimento bacteriano. O iodo apresentou efetividade bacteriostática quando utilizado nos tetos das bovinas, sendo possível verificar uma redução estatisticamente significativa ($p=0,001$) do número de UFC/mL.

Em um estudo semelhante, Medeiros et al. (2009) avaliaram o perfil de sensibilidade em relação ao *S. aureus*, os resultados demonstraram que 93% das amostras foram sensíveis ao iodo, 82% foram sensíveis à clorexidina, 55% das amostras foram sensíveis à amônia e 15% sensíveis ao ácido láctico e para as amostras de cloro, 97,8% foram resistentes, no tempo de 15 segundos, neste estudo os melhores resultados foram para iodo e clorexidina.

Nos resultados deste experimento, verificou-se que, com o uso do antisséptico clorexidina no grupo teste, 62,50% (15/24) das amostras foram positivas para *S. aureus*, em contrapartida, 37,50% (9/24) obtiveram ausência da bactéria. No grupo controle, 75,00% (18/24) das amostras foram positivas para a contaminação e 25,00% (6/24) foram negativas para crescimento

bacteriano. Foi possível notar uma redução de 37,50% das estirpes de *S. aureus* após o uso do antisséptico, quando comparado ao grupo controle, embora os resultados não tenham sido significativos estatisticamente ($p=0,3582$). Acredita-se que a modificação da concentração e do tempo de imersão poderiam ter gerado resultados mais contundentes na redução do crescimento bacteriano.

De acordo com Pedrini & Margatho (2003), durante a escolha dos agentes desinfetantes deve-se levar em consideração alguns critérios, pois não existe um desinfetante ideal, é necessário possuir um amplo espectro, ter o custo acessível, não ser tóxico, irritante e não causar danos à saúde do homem e do animal, pois o uso inadequado pode levar à resistência de cepas patogênicas.

Em relação ao ácido láctico, no grupo teste, em 70,83% (17/24) das amostras evidenciou-se a presença de *S. aureus* e 29,17% (7/24) das amostras não apresentaram crescimento bacteriano. No grupo controle, 95,83% (23/24) das amostras estavam contaminadas por *S. aureus* e 4,17% (1/24) das amostras não apresentaram crescimento.

Assim, em relação à eficácia do desinfetante frente ao *S. aureus*, a redução da carga microbiana foi de 29,17% no grupo teste, apresentando eficácia quando utilizado como antisséptico ($p=0,0201$).

No estudo de Nascif Jr (2005) foi avaliada a eficácia do ácido láctico e iodo na antisepsia dos tetos após a ordenha, os resultados indicaram maior eficácia do ácido láctico, comparado ao iodo, na redução do número de novos casos de infecções intramamárias (IIM).

É possível observar (Figura 1) a redução da carga microbiana com o uso dos antissépticos nos três experimentos realizados no presente estudo. O iodo apresentou melhor atividade antisséptica, significativamente superior ao ácido láctico e à clorexidina, frente ao *S. aureus* nas amostras analisadas no leite *in natura*.

O pré *dipping* utilizado antes da ordenha tem por objetivo reduzir ao máximo a contaminação dos tetos por micro-organismos. A desinfecção praticada no pré *dipping* é uma medida fundamental para o controle e prevenção da mastite ambiental, pois elimina da superfície dos tetos das fêmeas bovinas os agentes patogênicos, evitando

doenças nos quartos mamários e a posterior contaminação no leite. O uso da técnica traz benefícios como a estimulação da descida do leite e a velocidade de extração do leite (MAIA, 2012).

O estudo desenvolvido por De-meu et al. (2011) demonstrou vantagens no investimento de programas de controle e prevenção, pois contribui significativamente para diminuição dos custos relacionados à mastite. As despesas com tratamento preventivo representaram 19,7% do impacto econômico.

CONCLUSÃO

Os antissépticos utilizados neste trabalho demonstraram ser efetivos na redução do crescimento bacteriano no leite *in natura*, quando utilizados nos tetos das bovinas, ressaltando a importância do uso dos antissépticos no pré *dipping*, como sendo fundamentais para prevenção e redução de patógenos que colocam em risco a sanidade do animal, minimizando novas contaminações e consequentemente melhorando a qualidade do produto lácteo. Das substâncias testadas, a maior atividade antisséptica frente ao *Staphylococcus aureus* foi verificada para o iodo, seguido da clorexidina e do ácido láctico. Os resultados do estudo apontaram a sensibilidade do *S. aureus* aos antissépticos, ocorrendo o efeito bacteriostático nas amostras testadas. Verificou-se também que as concentrações testadas nos três experimentos foram eficazes para redução do patógeno.

REFERÊNCIAS

- BANDOCH, P; MELO, LS. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. Publicações UEPG. **Biol. Health Sci**, Ponta grossa, v.17, n.1, p.47-51, jan/jun, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **DOU**, Brasília (DF), p.6-11, 30 dez. 2011.
- BRITES, ASS et al. **Enumeração, isolamento, caracterização e controle da multiplicação de Staphylococcus aureus isolado de leite cru granelizado**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sudeste MG, Campus Rio Pomba / IF Sudeste MG. 17 de julho de 2013.
- CARMO, LS et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n.1, p.9-14, 2002.
- CUNHA NETO, A; SILVA, MGC; STAMFORD, MLT. Staphylococcus enterotoxigênico em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Cienc. Tecnol. Aliment, Campinas**, v.22, n.3, p.263-271, set./dez. 2002.
- DEMEU, FA et al. Influência do descarte involuntário de matrizes no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Cienc. Agrotec**. Lavras, v.35, n.1, p.195-202, jan.fev, 2011.
- DEMEU, FA et al. Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Rev Ceres**, Viçosa, v.62, n.2, p.167-174, mar-abr, 2015.
- LANCETTE, GA; TATINI, SR. *Staphylococcus aureus*. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 387-403.
- MAIA, PV. **Pré-dipping**: importância da prática e cuidados com as soluções. 2012. Disponível em: <<http://reha-gro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=2484>>.
- MASSEI et al. Mastite – diagnóstico, tratamento e prevenção: revisão de literatura. **Rev Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.6, n.10, Janeiro 2008.
- MEDEIROS, 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. **Pesq. Vet. Bras**. V.29, n.1, p.71-75, janeiro 2009.
- NASCIF JÚNIOR, IA. **Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina**. Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, São Paulo, 2005.
- PEDRINI, SCB; MARGATHO, LFF. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, out./dez., 2003.
- PEDRINI, SCB; MARGATHO, LFF. Mastite bovina e o uso de antissépticos. **Pesquisa & Tecnologia**, v.11, n.1, Jan-Jun 2014.
- PEIXOTO, MMR; GRESSLER, LT; SUTILI, FJ; COSTA, MM & VARGAS, AC. Action of products based on chlorhexidine and iodine for the adhesion and consolidated biofilm of *Staphylococcus spp.* isolated from milk. **Pesq. Veterinária Brasileira**, v.35, n.2, p.105-109, 2015.
- PERES NETO, F; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras. **Rev Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, SP, a. 9, n.16, 2011.
- TOZZETTI, DS et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. In: **Rev Cient. Eletrônica de Medicina Veterinária**. Garça, v.7, n.10, p.1-7, jan. 2008.