

AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES COMERCIAIS UTILIZADOS NO PRÉ E PÓS-DIPPING FRENTE À *Candida spp* ISOLADA DE LEITE MASTITICO BOVINO

IN VITRO EVALUATION OF THE EFFICACY OF COMMERCIAL DISINFECTANTS USED IN PRE AND POST-DIPPING AGAINST *Candida spp* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIC MILK.

L. C. AGOSTINHO SARTORI¹, R. C. SANTOS², J. M. MARIN³,

RESUMO

O objetivo desta investigação foi de avaliar a sensibilidade in vitro de cepas de *Candida spp*. Frente a vários desinfetantes comercialmente disponíveis, utilizados para o tratamento pré e pós-dipping. Foram obtidos 45 isolados de *Candida* em leite mastítico provenientes de vacas leiteiras acometidas de mastite clínica ou sub-clínica em quatro estados brasileiros. As drogas utilizadas foram clorexidina (2,0%), iodo (0,8%), iodo glicerinado (0,8%) e hipoclorito de sódio (1,0%) em 4 intervalos específicos de tratamento (15", 30", 60" e 300"). Cem por cento das cepas de *Candida* foram sensíveis a clorexidina nos tempos de 30", 60" e 300", ao iodo glicerinado em 60" e 300", ao hipoclorito de sódio em 60" e 300" e ao iodo apenas em 300". Assim se conclui que a eficácia mais alta de desinfecção foi encontrada para a clorexidina. Uma conclusão adicional é que é importante a realização periódica de avaliações de sensibilidade dos microrganismos aos desinfetantes comumente utilizados, de forma a garantir a eficácia da desinfecção dos tetos.

PALAVRAS-CHAVE: *Cândida*. Levedura. Desinfetante. Mastite.

SUMMARY

The objective of this investigation was to evaluate the in vitro sensibility of *Candida spp*. To several commercially available disinfectants used for pre and post-dipping.. A total of 45 isolates of *Candida* were obtained from the mastitic milk of dairy cows with clinical or subclinical mastitis from four Brazilian States. As active drugs were used chlorhexidine (2.0%), iodine (0.8%), iodine glycerin (0.8%) and sodium hypochlorite (1.0%) at four specific intervals (15 ", 30 ", 60 " and 300 "). One hundred percent of *Candida* was found to be sensible to chlorhexidine at 30 ", 60 ", and 300 ", to iodine glycerin at 60 " and 300 ", to sodium hypochlorite at 60 ", and 300 ", to iodine only at 300 ". It can be concluded that the highest disinfectant activity in vitro was found to be with chlorhexidine. A further conclusion was that it is important to undertake a periodic evaluation of the sensibility of microorganisms to the disinfectants commonly used, to guarantee the efficacy of the process of teat disinfecting.

KEY-WORDS: *Candida*. Yeast. Disinfectant. Mastitis.

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária- UNESP-Jaboticabal-SP.

² Doutora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária- UNESP-Jaboticabal-SP.

³ Professor Associado de Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia-FORP-USP - Campus Ribeirão Preto-SP. Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Avenida do Café s/n, Campus USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14040-904. Email: jmmarin@forp.usp.br

INTRODUÇÃO

A inflamação da glândula mamária (mastite) se mantém como a doença mais comum e dispendiosa em vacas leiteiras (BRADLEY & GREEN, 2001). Ela influencia negativamente a economia das propriedades rurais e a qualidade higiênica do leite (HORTET & SEEGER, 1998). Mais de 135 diferentes microorganismos tem sido identificado como agentes etiológicos da mastite (BRADLEY, 2002). Além dos agentes bacterianos, outros importantes grupos de microorganismos como leveduras, fungos e algas podem causar o processo inflamatório e alterações no úbere. (WATTS, 1988, KRUKOWSKI et al., 2006).

Leveduras e fungos são componentes normais da flora do solo e podem colonizar a pele do úbere em pequeno número (RICHARD et al., 1980). Eles são considerados agentes oportunistas (COSTA et al., 1993) e produzem a doença quando os mecanismos de defesa naturais estão debilitados. As diferentes espécies de *Candida* representam os organismos mais freqüentemente isolados como agentes etiológicos da mastite micótica em glândulas mamárias infectadas (WATTS, 1988).

O processo de desinfecção é um aspecto muito importante para a prevenção da doença. Muitos desinfetantes foram especialmente desenvolvidos para a indústria leiteira visando prevenir a expansão de doenças infecciosas (PANKEY et al., 1984, OLIVER et al., 1993, AMARAL et al., 2004, MEDEIROS et al., 2009), as quais podem ser controladas com o uso contínuo e eficiente destes agentes germicidas antes e após a ordenha.

O presente trabalho foi realizado para testar a susceptibilidade de cepas de *Candida spp* obtidas de mastite bovina a desinfetantes comercialmente disponíveis e comumente utilizados em fazendas leiteiras no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de animais

O estudo foi conduzido com vacas de fazendas leiteiras mantidas sob o sistema de criação intensiva, distribuídas em quatro estados brasileiros, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os rebanhos analisados eram constituídos por animais de diferentes raças, idades e encontravam-se em diferentes fases de lactação.

Crítérios para a classificação em mastite clínica ou sub-clínica

A mastite clínica foi caracterizada por sinais clínicos e/ou secreção de leite anormal detectada pelo teste da caneca de fundo preto. A mastite sub-clínica foi identificada pelo CMT (California Mastitis Test) convencional.

Amostras de leite

Quarenta e cinco amostras de leite de quartos com mastite clínica ou sub-clínica foram coletados no período de Fevereiro a Dezembro de 2009.

As amostras de leite foram assepticamente coletadas e semeadas em agar Sabouraud dextrose (Oxoid). As placas foram incubadas a 37 °C por 72h. As leveduras foram fenotipicamente caracterizadas por teste padrão (RICHARD et al., 1980, KREGER-VAN RIJ, 1984, BARNETT et al., 1990). Depois de identificadas, um isolado de cada placa foi mantido em Agar Sabouraud dextrose a temperatura ambiente.

Avaliação da eficácia dos desinfetantes in vitro

Para todas as avaliações, foram usadas culturas frescas de células de *Candida* (48h) crescidas em agar Sabouraud dextrose. Para cada cepa de *Candida* foi preparada uma suspensão de células em solução salina estéril (0,85%) ajustada para o tubo 1 da escala de McFarland. Em seguida 1,2ml de cada suspensão foram transferidas para um tubo de vidro esterilizado contendo 0,2 ml de leite esterilizado, foram acrescentados 0,8ml de cada desinfetante selecionado, clorexidina (2,0%), iodo (0,8%), iodo glicerinado (0,8%) e hipoclorito de sódio (1,0%). As amostras foram submetidas a diferentes tempos de contato entre as células e os desinfetantes: 15, 30, 60 e 300 segundos. Decorrido o tempo estabelecido, 0,1 ml de cada tubo foi semeado em placa contendo Caldo Sabouraud dextrose a 37 °C por 24h para verificação da turvação e/ou a formação de película ou precipitação de células. O teste foi feito com três repetições.

Depois da incubação com o respectivo desinfetante, foi realizada a semeadura de 0,1 ml do conteúdo de cada tubo em placa contendo Agar Sabouraud dextrose e em seguida as placas foram submetidas à incubação a 37 °C por 24h para verificação da presença ou ausência de crescimento de *Candida* (COSTA et al., 1998).

RESULTADOS

Os resultados do teste de suscetibilidade das 45 cepas de *Candida spp*. para os diferentes tempos de exposição com os diferentes desinfetantes estão mostrados na Figura 1.

Exceto para ao iodo (0,8%), os outros desinfetantes foram cem por cento eficientes após 60 segundos de contato para destruir as células de *Candida*. Todos os testes foram conduzidos com três repetições para cada isolado para maior garantia dos resultados obtidos.

DISCUSSÃO

As leveduras são microorganismos encontrados na natureza e freqüentemente são isoladas de humanos e animais doentes. Dentre as leveduras, as espécies de *Candida* representam o patógeno eucariótico mais comumente isolado de infecção de glândulas mamárias

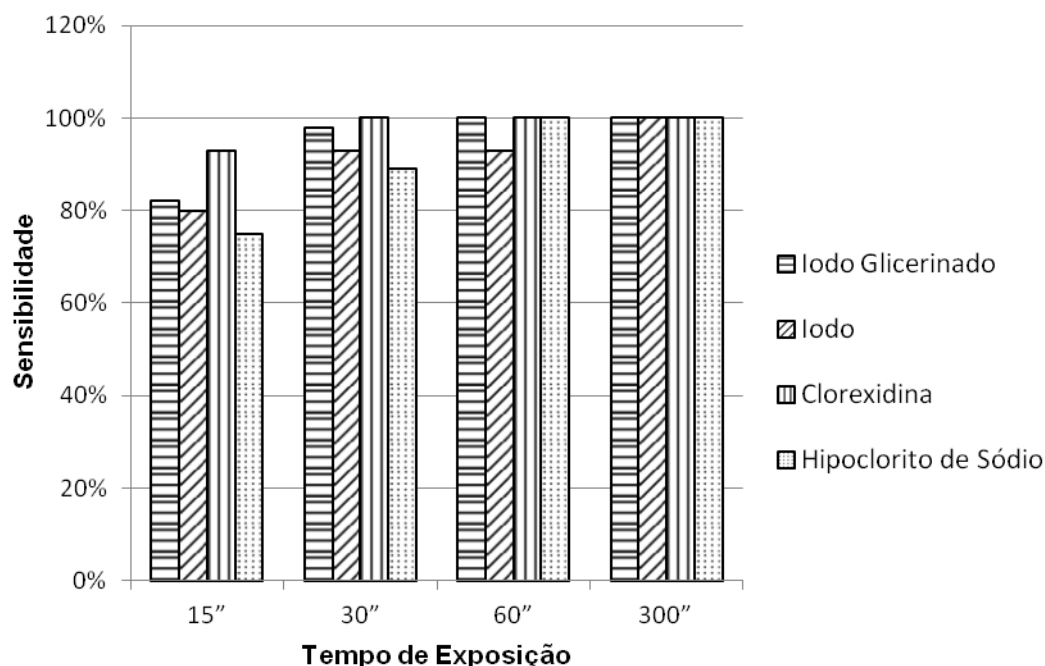


FIGURA 1 - Porcentagem da eficácia in vitro dos desinfetantes utilizados no pre e post-dipping para cepas de *Candida spp* isoladas do leite de vacas apresentando mastite provenientes de fazendas de leite de quatro estados brasileiros em 2009.

de vacas leiteiras. Geralmente elas são consideradas patógenos oportunistas e a mastite se desenvolve quando existe um grande número de microrganismos presentes no teto e associado a uma queda na resistência das defesas do úbere. Também, a pele do úbere, as mãos dos indivíduos que realizam a ordenha, a máquina de ordenha, a palha da cama dos animais, o pasto, a poeira, as drogas e as soluções sanitizantes são fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (QUINN et al., 2002). Entre estes fatores as soluções sanitizantes têm sido estudadas porque elas podem representar um importante fator de diminuição da inflamação das glândulas mamárias mas podem também provocar uma irritação na pele dos tetos o que depende muito da concentração do produto utilizado.

Bons desinfetantes devem ter eficácia contra os principais patógenos encontrados nas mastites, devem ser econômicos, fáceis de aplicar, e devem manter ou promover boas condições de higiene. A maioria dos estudos está relacionada ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. (PANKEY et al., 1984, BOODIE et al., 1997, PEDRINI & MARGATHO, 2003, AMARAL et al., 2004, MEDEIROS et al., 2009), resultados obtidos com outros microrganismos, incluindo as espécies de *Candida* são raros (LOPES et al., 2008).

No presente trabalho os testes foram realizados com os 4 desinfetantes mais utilizados para controlar a mastite causada por patógenos, a clorexidina (BOODIE et al., 1997, MEDEIROS et al., 2009), o hipoclorito de sódio (AMARAL et al., 2004), o iodo (BOODIE et al.,

1997) e o iodo glicerinado (GOLDBERG et al., 1994). Os resultados obtidos demonstraram que o tempo de exposição/ contato entre as células do patógeno e os desinfetantes é crucial e deve ser de no mínimo 60 segundos.

Os melhores resultados foram obtidos com a clorexidina (2,0%) que não é irritante para a pele do teto. Deve porém ser lembrado que os resultados de sensibilidade dos microrganismos para os desinfetantes obtidos in vitro não necessariamente correspondem aos resultados que podem ser obtidos in vivo. Eles devem portanto serem considerados apenas como um indicativo do desempenho do melhor desinfetante avaliado. Depois disto como uma comprovação dos resultados obtidos se faz necessário a realização de um trabalho de campo com diferentes condições do meio ambiente e utilizando diferentes rebanhos para atestar a eficácia do desinfetante para controlar os diferentes patógenos causadores da mastite.

Como conclusão pode-se afirmar ser necessária uma revisão periódica da sensibilidade dos microrganismos frente aos desinfetantes para assegurar a correta desinfecção do úbere.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Maria da Graça Portantiolo Corrêa e a Vitafort Indústria e Comércio pelas amostras de leite mastítico disponibilizadas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A.; ROMANO, A. P. M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JR, O. D. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteadas e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.173-177, 2004.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and Identification**. Cambridge University Press, 2nd edn, 1990.
- BOGGIE, 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, p.2809-2814, 1997.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v.164, p.116-128, 2002.
- BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. **Veterinary Record**, v.148, p.683-686, 2001.
- COSTA, E. O.; GANDRA, C. R.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S. D.; TEIXEIRA, C. M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-17, 1993.
- COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; GARINO JR, F.; SILVA, J. A. B.; THIERS, F. O. Avaliação in vitro dos desinfetantes utilizados na pós ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina. **Revista Napgama**, v.1, n.1, p.18-22, 1998.
- GOLDBERG, J. J.; MURDOUGH, P. A.; HOWARD, A. B.; DRECHSLER, P. A. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.33, p.740-747, 1994.
- HORTET, P.; SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. **Veterinary Record**, v.29, p.497-510, 1998.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeast: A Taxonomic Study**. Amsterdam, Elsevier, 1984, 1082pp.
- KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.; ROZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, v.150, p.5-7, 2000.
- LOPES, M. M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, D.; FREITAS, G. In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca spp.* Isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. **Journal of Mycologie Medicale**, v.18, p.205-209, 2008. **Amostras de leite**
- MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; FARIA, E. B.; WANDERLEY, G. G.; TELES, 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.
- OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; INGLE, T. L.; GILLESPIE, B. E.; MATTHEWS, K. R. Prevention of bovine mastitis by a premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.287-292, 1993.
- PANKEY, J. W.; EBERHART, R. J.; CUMING, A. L.; DAGGETT, R. D.; FARNSWORTH, R. J.; MCDUFF, C. K. Uptake on Postmilking teat antiseptics. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1336-1353, 1984.
- 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. **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, n.4, p.391-395, 2003.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Veterinary microbiology and microbial disease**. Iowa: Blackwell, 2002.
- RICHARD, J. L.; MCDONALD, D. V. M.; FICHTNER, R. E.; ANDERSON, A. J. Identification of yeast from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.12, p.1991-1994, 1980.
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1998.