

PERFIL DE SENSIBILIDADE À SANITIZANTES DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA ORIUNDOS DO PROCESSO DE ORDENHA.

FRANCIELI DELL'OSBEL¹; JÉSSICA DAL VESCO,
NATACHA DEBONI CERESER, MAYRA ROCHA; CAROLINE DA LUZ DE
FREITAS²; HELENICE DE LIMA GONZALEZ³

¹UFPEL – fran_delloosbel@hotmail.com

²UFPEL– jessica.dalvesco@gmail.com

²UFPEL– natachacereser@gmail.com

²UFPEL–mayra.benji@gmail.com

²UFPEL–carolineluzf@gmail.com

³UFPEL – helenicegonzalez@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que o leite é um dos alimentos essenciais para a alimentação humana, portanto sendo produzido no mundo inteiro. Se tratando da produção de leite brasileira, encontra-se o Brasil ocupando o quinto lugar na maior produção de leite, ficando atrás de países como a Índia, Estados Unidos da América, China e Paquistão (JUNG; JÚNIOR, 2017).

Diante de tamanha dimensão da prática leiteira surgem desafios enfrentados por produtores e indústrias, sendo um destes, a mastite. Define-se mastite como a inflamação do parênquima da glândula mamária, sendo de origem variada e que leva a uma série de modificações do leite, estas sendo físicas e também químicas, além das alterações patológicas no tecido glandular do animal (BENEDETTE et al., 2008).

O *Staphylococcus* coagulase positiva é um dos micro-organismos causadores de infecções alimentares e, também, é o principal gênero causador de mastite bovina (WHIST et al., 2009; SOUTO et al., 2008; SENA, 2000). Também é conhecido pela sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos veterinários e humanos e, segundo Rajala-Schultz et al. (2004), é possível que cepas multirresistentes encontradas em animais produtores de alimentos possam contaminar os produtos alimentícios.

Para obtenção de um leite de qualidade e seguro ao consumidor, além do controle sanitário do rebanho, é necessário que todos os utensílios e equipamentos sejam higienizados, utilizando-se água potável e em temperatura adequada, com detergentes e sanitizantes apropriados (EMBRAPA, 2005; PENG et al., 2002). Atualmente, já existe inúmeros estudos monitorando a ação dos antimicrobianos sobre os micro-organismos, no entanto são poucos os estudos verificando a atividade dos desinfetantes sobre esses micro-organismos ou a susceptibilidade destes organismos frente aos sanitizantes (AVANCINI; BOTH, 2017).

Frente a esse panorama, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação de desinfetantes frequentemente utilizados na higienização de tetos, equipamentos e os utensílios frente à isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva de pontos de contaminação da ordenha.

2. METODOLOGIA

Os isolados utilizados no trabalho, são oriundos de quatro propriedades participantes do Projeto de Desenvolvimento da Bovinocultura Leiteira da Região

Sul do Rio Grande do Sul. Dessas propriedades, três delas possuem sistema de ordenha balde ao pé e uma sistema de ordenha canalizada. Duas estão localizadas no município de Pelotas e as outras duas no município Capão do Leão. As amostras de leite foram coletadas diretamente do insuflador das teteiras, coador, das mãos do ordenhador e do leite. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica e enviadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA – UFPel), onde foi realizada o isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2003).

Para a realização do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) (CLSI, 2015) foram utilizadas 23 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva. Primeiramente, foi depositado 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MH) em cada poço de uma placa de microdiluição de 96 poços. Então era adicionado 100µL do sanitizante testado em diluições seriadas (1:2) da segunda até a 11ª coluna. Com esse procedimento de diluição, a concentração do sanitizante era sempre a metade da concentração da coluna anterior. A coluna 1 servia como controle negativo do caldo MH e a coluna 12 como controle dos sanitizantes.

O inóculo foi preparado utilizando-se diluições em Solução Salina 0,85% a partir de colônias isoladas *Brain Heart Infusion Agar* (BHA), até a DO 0,5; após o ajuste, 0,5 mL da diluição da solução salina 0,85% foi repassada para 4,5 mL de caldo MH. Desta cultura, 50µL foi depositado na microplaca, em triplicata, da segunda até a 11ª coluna. As microplacas foram incubadas a 36°C ± 1° durante 24 horas, após esse período, foi realizado a leitura considerando a presença ou ausência de turbidez do meio de cultura. Os sanitizantes utilizados foram: ácido láctico (8% - 80.000 mg/L), hipoclorito de sódio (8% - 80.000 mg/L) e iodo (2% - 20.000 mg/L). As concentrações foram escolhidas para abranger concentrações maiores e menores que as indicadas para o uso de acordo com as instruções do fabricante.

A CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi realizada para todos os isolados testados (SANTURIO et al., 2007), onde foram retirados 10 µL a partir dos poços sem crescimento, semeados em Ágar Mueller-Hinton e incubados em estufa 36°C ± 1°/24h, após o período, a leitura foi realizada considerando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a CIM (mg/mL) dos sanitizantes frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foram encontradas as seguintes médias: 1.394,9 mg/mL de iodo, 710,33 mg/mL de ácido láctico e 4.288,95 mg/mL de hipoclorito de sódio. Já para a CBM foram obtidas as médias: 1.879,5 mg/mL de iodo, 1779,15 mg/mL de ácido láctico e 6.005,4 mg/mL de hipoclorito de sódio.

A CIM e a CBM encontradas, foram concentrações menores que as recomendações de uso desses produtos, atualmente. Os melhores resultados no *pós-dipping* têm sido obtidos com as seguintes concentrações de compostos: iodo 0,7-1,0% e cloro 0,3-0,5% (4% hipoclorito de sódio). No *pré-dipping*, os produtos tradicionalmente utilizados são: hipoclorito de sódio a 4%, iodo a 0,5-1% e clorexidina a 0,5% (SANTOS e FONSECA, 2019). Em ambos os casos deve-se fazer a imersão completa dos tetos em solução desinfetante. Uma hipótese que explica as baixas concentrações encontradas em nosso estudo, é o tempo de exposição dos isolados aos sanitizantes. Nos testes realizados nas placas de microdiluição, os sanitizantes ficaram em contato com o isolado durante 24 horas,

tempo maior se comparado com o tempo de ação recomendado no *pré-dipping*, que é de 30 segundos (SANTOS e FONSECA, 2019).

Ao testar desinfetantes à base de hipoclorito de sódio a 0,5% frente às cepas de *S. aureus* (ANDRADE e FURLAN, 2009), foi verificado e comprovado a eficácia da ação deste sanitizantes, fato similar ao nosso estudo.

Ao isolar cepas de *S. aureus* durante o processamento de queijo tipo mussarela e testar essas cepas frente ao hipoclorito de sódio e iodóforo, obtiveram ação a partir de 118mg/L e 200mg/L, respectivamente (NICOLAU et al., 2010). A diferença dos achados do nosso estudo, pode ser explicada pelo método utilizado pelo estudo durante o processamento de queijo (NICOLAU et al., 2010), que utilizou o teste de disco preconizado pelo INCQS (INCQS, 1985), havendo variabilidade do teste e, portanto, incerteza quando a eficácia dos produtos. No nosso estudo, utilizamos diversas diluições dos sanitizantes frente aos diferentes isolados de *Staphylococcus* spp. e os testes foram realizados em três repetições, garantindo resultados mais precisos.

4. CONCLUSÕES

Com esse estudo foi possível verificar a ação variável de alguns sanitizantes frente aos isolados dos pontos de contaminação da ordenha e determinar a concentração inibitória mínima. A partir desse estudo serão testados o tempo necessário de exposição dos isolados frente aos sanitizantes e posteriormente o seu comportamento nas superfícies dos equipamentos de ordenha.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D.C.C; FURLAN, C.M. Avaliação da estabilidade físico-química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% utilizada pela FARMAUSCS e de sua eficácia bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev Bras Ciênc Saúde**. Publicação do Centro de Saúde USCS. Universidade São Caetano do Sul – Ano VII nº 21, jul/set 2009 – São Caetano do Sul (SP): USCS, 2009.

AVANCINI, C. A. M.; BOTH, J. M. C. Atividade bactericida de três desinfetantes sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, 2017.

BENEDETTE, Marcelo Francischinelli et al. Mastite Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 6, p.1-5, jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003**.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing, twentieth information supplement, document M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

EMBRAPA. **Boas práticas agropecuárias na produção leiteira- parte I**. Brasília, 2005 Disponível em: www.agricultura.gov.br Acesso em 23 de set. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). Técnica para controle de qualidade, avaliação da atividade antibacteriana de saneantes domissanitários, 1985. (manual técnico nº4).

JUNG, C.F.; JÚNIOR, A. A. M. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**. Santa Cruz do Sul, v.19, n. 01, p. 34-47, jan./jun. 2017.

NICOLAU, E. S., KUAYE, A. Y., MESQUITA, A. J. D., & OLIVEIRA, A. N. D. Eficiência de soluções de hipoclorito de sódio e Iodóforo na redução de *Staphylococcus aureus* isoladas durante o processamento de queijo tipo mussarela. 2010. Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **Int J Food Microbiol**. v. 77, n.1, p. 11-8, 2002.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J.S.; LOVE, B. C.; Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**. V.102, p. 33-42, 2004.

SANTOS, M. V; FONSECA, L. F.L. **Qualidade do leite e controle da mastite**. Pirassununga: Copyright, 2019.

SANTURIO M. J., SANTURIO D. F., POZZATI P., MORAES C., FRANCHIN P. R., ALVES S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Cien. Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SENA, M. J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e ao conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalhos comercializados em Recife-PE. 2000. 75p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SOUTO, L. I. et al. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **Journal of Dairy Research**. Cambridge. V.75, p.121-127, 2008.

WHIST, A. C.; OSTERAS, O.; SOLVEROD, L. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v. 76, p.24-35, 2009.