

ISOLAMENTO FÚNGICO EM LEITE DE BOVINOS E TESTE DE EFICÁCIA DE DESINFETANTES FRENTE ÀS LEVEDURAS

ESTEVES, Isabel de Abreu¹; FERREIRA, Gracialda Ferreira²; SANTOS, Patrícia Jacob³; PIVA, Natalia Vanoni²; FREITAS, Thayline Machado²; GONZALEZ, Helenice de Lima⁴; NASCENTE, Patrícia da Silva⁵.

¹ Graduanda da Faculdade de Enfermagem e Obstetrícia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel. ² Graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel. ³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. ⁴ Professora Adjunto – Faculdade de Veterinária – UFPel. ⁵ Professora Adjunto Microbiologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel.
bel.esteves@live.com

1 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 (PEDRINI; MARGATHO, 2003). Sob o ponto de vista econômico, a mastite é a doença mais relevante de bovinos leiteiros em todos os continentes, afetando drasticamente a produção e a qualidade do leite e derivados (PYÖRÄLÄ, 2002).

Entre os agentes considerados ambientais, leveduras têm sido relacionadas como patógenos emergentes em função das mudanças verificadas nos sistemas de produção de leite e nos programas de controle da mastite bovina, na última década (COSTA, 2008).

A presença de fungos no leite pode estar associada à ocorrência de casos de mastite infecciosa no rebanho, ou pode estar relacionada ao nível de higiene da ordenha e do ambiente. A prevalência da mastite micótica é de aproximadamente 1% a 12% do total de mastites de origem infecciosa. Em alguns rebanhos esse número pode aumentar em surtos, em geral por problemas de manejo, podendo afetar a maioria das vacas em lactação (KRUKOWSKI & SABA, 2003).

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 (PEDRINI; MARGATHO, 2003).

A mastite infecciosa subclínica é aquela que apresenta resultado positivo aos testes de California Mastitis Test (CMT), ou outros testes indicativos, sendo confirmada pelo crescimento microbiano (RIBEIRO et al., 2002).

Dentro deste contexto, este estudo objetivou o isolamento de fungos a partir de amostras de leite com resultado de CMT positivo e realização de teste de suscetibilidade *in vitro* das leveduras isoladas frente a desinfetantes utilizados com pré e pós-*dipping*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

As visitas para coleta de amostras de leite foram realizadas em onze propriedades do município de Pelotas – RS, com acompanhamento da EMATER. As amostras de leite foram coletadas de quartos de vacas com resultado positivo ao CMT. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia da UFPel e semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas em estufa de 32°C por até sete dias. Após isolamento de colônias, estas foram identificadas através da macro e micromorfologia com utilização de lactofenol azul de algodão entre lâmina e lamínula e microcultivo. E para as leveduras foi realizada a técnica de Gram e sistema Vitek 2 para identificação.

Selecionou-se cinco leveduras para o teste de suscetibilidade, onde foram utilizadas placas de microdiluição estéreis, onde foram feitas dez diluições sucessivas (1:2) de dois desinfetantes, os quais foram: Hipoclorito de sódio (HS) 5% e Clorexidina (CL) 0,12%. A escala de concentrações do Hipoclorito de Sódio variou de 1,25% à 0,00244 %, a escala para Clorexidina variou de 0,03% à 0,000058%, em cada diluição foram dispostos os inóculos fúngicos previamente ajustados na escala de Mc Farland (tubo 0,5) e diluídos em meio RPMI líquido. A técnica utilizada foi baseada na metodologia proposta pelo documento M27-A3 (CLSI, 2008) adaptada aos desinfetantes. As placas foram incubadas a 36º/48h e após este período foi realizada leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram a presença de fungos leveduriformes e filamentosos em leite com resultado CMT positivo. Das 565 amostras de leite coletadas, foi observado o isolamento fúngico em 16 (2,83%). As espécies isoladas foram *Candida guilliermondii*, *Candida peliculosa*, *Candida rugosa*, *Candida krusei*, *Candida ciferrii*, *Candida pulcherrima*, *Rhodotorula* sp, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporum mucoides* e *Trichosporum* sp, *Penicillium* spp (3), *Aspergillus* spp e *Alternaria* sp. As espécies encontradas possuem potencial patogênico, entretanto ainda não é possível afirmar sobre a relação causal da presença desses agentes e o desenvolvimento da mastite subclínica.

Para o teste de suscetibilidade aos desinfetantes selecionou-se as cinco leveduras de maior frequência em isolamento: *Candida guilliermondii*, *Candida peliculosa*, *Candida rugosa*, *Candida krusei*, *Candida ciferrii*. Todas as leveduras testadas apresentaram sensibilidade frente aos dois desinfetantes, variando em alguns casos a CIM. Frente ao HS a CIM variou de 1,25% à 0,0097%. Em relação a CL, a CIM variou de 0,03% à 0,0000585% de acordo com a espécie conforme Tabela I.

Tabela 1 – Descrição da Concentração Inibitória Mínima do Hipoclorito de Sódio (HS) e da Clorexidina (CL) frente às cinco leveduras isoladas de leite com resultado CMT positivo ,

Espécie	HS 5%	CL 0,12%
<i>C. rugosa</i>	0,03906%	0,0000585%
<i>C. krusei</i>	0,0195%	0,0004687%
<i>C. guilliermondii</i>	0,00097%	0,0000585%
<i>C. peliculosa</i>	0,07812%	0,0000585%
<i>Candida ciferrii</i>	0,03906%	0,0002343%

A clorexidina se mostrou mais eficaz na sua ação desinfetante do que o hipoclorito, de acordo com as recomendações de uso do fabricante, uma vez que a quantidade utilizada para uma ação satisfatória dos produtos foi menor do que a recomendada pelo mesmo. Já o hipoclorito teve ação esperada, mas dentro da concentração indicada pelo fabricante.

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).

A concentração de hipoclorito de sódio recomendada para uso que é de em torno de 150ppm (AMARAL et al., 2004) e a qual se refere à aproximadamente 0,015%.

Entretanto, na literatura se considera que a boa higiene proporcionada pelo HS depende de um tempo maior de contato com a superfície (Bessems, 1998).

4 CONCLUSÃO

O uso de Hipoclorito de sódio e Clorexidina inibiram as leveduras do gênero *Candida*, isoladas de leite com mastite, entretanto a Concentração Inibitória Mínima da Clorexidina foi menor que a do Hipoclorito de sódio.

5 REFERÊNCIAS

COSTA, G.M. da et al . Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, Out. 2008.

KRUKOWSKI, H. & SABA, L. Bovine mycotic mastitis (A Review). **Folia Veterinária**, v.47, n.1, p.3-7, 2003.

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**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.211, p.211-216, 2002.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; TUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do rio grande do sul. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

SPINOSA, H.S.; GORNIÁK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 389-394.