

Capítulo 12

Patógenos alimentares em leite de bovinos com mastite subclínica

Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza*¹; Laura Francielle Ferreira Borges²; Ester Dias Xavier³; Samuel Ferreira Gonçalves⁴; Carolina Magalhães Caires Carvalho⁵, Cintya Neves de Souza⁶

Resumo

Patógenos causadores de intoxicações alimentares também são descritos em mastite subclínica e relatados na literatura em alimentos lácteos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* presentes em amostras de leite bovino com mastite subclínica. Para isso, foi realizada coleta de amostras em tetos de bovinos com mastite subclínica em oito fazendas de produção leiteira no norte de Minas Gerais. Os patógenos foram isolados, identificados e foi procedido o antibiograma para detectar sensibilidade aos antimicrobianos oxacilina-1µg (OXA), cefoxitina-30µg (CFO) e amoxicilina-10µg (AMO) para *Staphylococcus aureus* e ampicilina-10µg (AMP), ciprofloxacina-5µg (CIP), cefoxitina-30µg (CFO), gentamicina-10µg (GEN), amoxicilina-10µg (AMO), norfloxacin-10µg (NOR), neomicina-30µg (NEO) e tetraciclina-30µg (TET) para *Escherichia coli*. Como resultado, foram detectados 14 *Staphylococcus aureus*, dos quais 12 apresentaram resistência a, pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo 2 destes isolados considerados resistentes a metilicilina (MRSA). Foram detectados, também, 3 isolados de *Escherichia coli*, todos resistentes a amoxicilina. Entre todos os antibióticos testados, a maior frequência de resistência foi contra a amoxicilina. É necessário um bom controle microbiológico do leite desde sua produção no rebanho.

Palavras-chave: Doenças Transmitidas por Alimentos, *Escherichia coli*, Resistência bacteriana, *Staphylococcus aureus*.

¹Mestranda em Produção Animal- Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais

²Graduanda em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

³Graduanda em Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Mestrando em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

⁵Servidora técnica - Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais.

⁶Servidora técnica - Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais.

*Autor para correspondência: geziella.ufmg@gmail.com

Introdução

Leite é um alimento que deve possuir uma variedade de microrganismos úteis a indústria alimentícia e benéficos ao consumo humano. Porém, se não houver higiene e controle de qualidade desde a ordenha, pode conter patógenos capazes de causar doenças alimentares, sendo que alguns deles se tornam presentes mesmo em alimentos processados (HACHIYA, 2017).

O principal patógeno associado a mastite bovina, a bactéria *Staphylococcus aureus*, é também associado a intoxicações alimentares em humanos (COSTA *et al.*, 2018). Outro patógeno também citado em mastite bovina (GAO *et al.*, 2014) e produtor de toxinas que causam doenças alimentares é a bactéria *Escherichia coli* (PATTABIRAMAN, *et al.*, 2018). Embora a *Escherichia coli* seja detectada em menor proporção como patógeno em mastite bovina, deve-se atentar que este microrganismo é de importância clínica, possível causador de doenças transmitidas por alimentos em humanos.

Nos estudos de Johler *et al.* (2018), 80% das amostras de leite cru para produção de queijo artesanal na Itália estavam contaminadas com *Staphylococcus aureus*, sendo que muitas destas bactérias continham genótipo associado a capacidade de causar mastite e de produzir toxinas alimentares. Hachiya (2017) detectou *Staphylococcus aureus* em produtos lácteos brasileiros como queijo fundido.

A legislação brasileira se atenta sobre a qualidade microbiológica do leite e sanidade do rebanho (BRASIL, 2017), pois o controle deve ser feito desde a produção, uma vez que espécies patogênicas presentes em um meio rico em nutrientes como é o leite podem rapidamente se multiplicar e alcançar proporções preocupantes.

Com base nessas premissas, o presente estudo objetivou verificar a ocorrência de patógenos alimentares do tipo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em leite de bovinos com mastite subclínica em fazendas de produção leiteira no norte de Minas Gerais.

Material e métodos

Em oito fazendas de produção leiteira no norte de Minas Gerais, foi realizado nas fêmeas de bovinos, o teste da caneca telada e California Mastitis Test (CMT) para identificação de mastite. Foram excluídos os tetos com mastite clínica e tomados para estudo os que apresentaram mastite subclínica, considerando CMT positivo com duas a três cruzes. Logo após, foi procedida lavagem do teto com água corrente, secagem em papel toalha e antissepsia com álcool 70% (PU *et al.*, 2014). Em

seguida, as amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis de 5 ml com tampa em rosca e enviadas em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório de Sanidade Animal, no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As amostras foram processadas em capela de fluxo laminar, utilizando alça microbiológica de 10 µL e procedendo sementeira por esgotamento em ágar sangue ovino a 5% V/V. As placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiano a 37°C ± 2 por 24 horas. Havendo crescimento, foi realizada coloração de Gram de modo a selecionar os bacilos Gram negativos e os cocos Gram positivos agrupados em cachos. As bactérias selecionadas como cocos Gram positivos foram ainda submetidas a teste de coagulase, visando selecionar os de resultado coagulase positivo.

Por fim, a identificação confirmativa foi procedida por espectrometria de massa *Matrix Associated Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI- TOF), segundo metodologia descrita por Assis et al (2017). Para isso, foi feito um esfregaço fino de cada colônia microbiana pura na placa MALDI e, após secar em temperatura ambiente, foi aplicado nos esfregaços das bactérias 1 µL de ácido fórmico a 70%. Após secar novamente, foi aplicado em todos os esfregaços, 1µL de reagente matriz. Aguardou-se secar novamente e a placa contendo os esfregaços individuais de cada colônia microbiana foi inserida no sistema MALDI acoplado a um monitor em que foram cadastradas as amostras (Figura 1). Dentro do aparelho, a placa foi carregada até um ponto em que as amostras ionizadas realizaram um “vôo”, sendo o tamanho desse vôo conforme o peso ou massa do microrganismo. De acordo com a medição do tamanho do vôo e, conseqüentemente da massa do microrganismo, pode-se obter com precisão sua identificação comparando a outros microrganismos já conhecidos, previamente identificados no banco de dados.

Figura 1 – Procedimentos de identificação microbiana por MALDI-TOF realizada com isolados bacterianos de leite bovino com mastite subclínica



Fonte: Dos autores, 2019

As bactérias identificadas foram avaliadas quanto a sua resistência ou sensibilidade a diversos antibióticos conforme metodologia preconizada pelo *Control Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Para as bactérias Gram positivas, foram utilizados os antimicrobianos oxacilina-1µg (OXA), cefoxitina-30µg (CFO) e amoxicilina-10µg (AMO). Para as bactérias Gram negativas, foram utilizados ampicilina-10µg (AMP), ciprofloxacina-5µg (CIP), cefoxitina-30µg (CFO), gentamicina-10µg (GEN), amoxicilina-10µg (AMO), norfloxacina-10µg (NOR), neomicina-30µg (NEO) e tetraciclina-30µg (TET).

Resultados e discussão

Foram encontradas nas amostras de leite, 17 isolados bacterianos, 14 identificados por MALDI-TOF como *Staphylococcus aureus* e três como *Escherichia coli*. O perfil de resistência fenotípica dessas bactérias aos antimicrobianos testados é mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Perfil fenotípico de resistência a antibióticos apresentado por bactérias provenientes de leite de bovinos com mastite subclínica

Isolado bacteriano	Caracterização Fenotípica de Resistência	Frequência N (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFO, OXA, AMO	1 (7,1%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CFO, AMO	1 (7,1%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	AMO	10 (71,4%)
<i>Escherichia coli</i>	AMO	3 (100%)

Fonte: Dos autores, 2019

No geral, as maiorias das bactérias apresentaram resistência aos antibióticos testados. Podem ser observados 2 isolados de *Staphylococcus aureus* caracterizados com resistência a oxacilina ou cefoxitina. São assim considerados MRSA (CLSI, 2018).

A metilina já é uma droga utilizada contra bactérias resistentes produtoras de penicilinas (HACHIYA, 2017). A resistência a metilina exclui a possibilidade de tratamento por esta droga em bactérias já resistentes a outros antibióticos.

Considerando que, genes como *mecA* que expressa resistência a meticilina (CLSI, 2018) podem ser transferidos de uma bactéria a outra através de conjugação ou também por transdução, é necessário precaução também contra a transmissão da resistência bacteriana.

Os isolados de *Escherichia coli* apresentaram em sua totalidade resistência a amoxicilina. Em contrapartida, apresentaram sensibilidade as demais drogas testadas. Mas mesmo sendo sensível, existe a possibilidade de ela ser causadora de diarreia (PATTABIRAMAN, *et al.*, 2018).

S. aureus e *E. coli* são espécies associados a surtos de infecção alimentar humana (SIQUEIRA, 2017; PATTABIRAMAN, *et al.*, 2018). A qualidade microbiológica do leite cru é importante tanto no que diz respeito aos microrganismos advindos do leite e úteis para a fabricação de determinados produtos lácteos, quanto ao perigo de patógenos, causadores de doenças transmitidas por alimentos e suas resistências ao tratamento antimicrobiano.

Conclusão

A qualidade microbiológica do leite desde sua produção inicial é de suma importância. Espécies patogênicas podem estar presentes em leite bovino e apresentarem resistência a diferentes antibióticos. Nesse sentido, é necessário que haja um bom controle de qualidade, tanto para evitar transmissão de patógenos, quanto para evitar a transferência de genes responsáveis pelas resistências microbianas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais. CNPq e UFMG/PRPq.

Referências

ASSIS, G. B. N. *et al.* Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Front Microbiol**, v. 9, n. 8: p. 1492, 2017.
BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. 30 mar 2017. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=NzU2NQ%2C%2C>>. Acesso 10 Mar 2019.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing** Wayne, PA. 28th ed. CLSI supplement M100: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COSTA, F. N. *et al.* Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, n. 50: p. 1089–1097, 2018.

GAO, J. *et al.* Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n.6: p. 4797-4806, 2017.

HACHIYA, J. O. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from curd cheese “requeijão” and “especialidade láctea type requeijão” sold in Brazil. **Ciência Rural - Santa Maria**, v.47, n. 7, 2017.

JOHLER, S. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy (Short communication). **J. Dairy Sci**, v.1, n.1: p 2915–2920, 2018

PATTABIRAMAN, V. *et al.* Genome wide characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from multiple outbreaks and sporadic infections from 1975-2016. **Plos One**, v. 13, n.12: e0208735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208735>.

PU, W. C *et al.* High Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. **Plos One**, v. 9, n. .2, 2014.

SIQUEIRA, A. K. *et al.* Genes de enterotoxinas, multirresistência a antimicrobianos e caracterização molecular de espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite bovino orgânico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 54, n.1: p. 81-87,