

PESQUISA DE CONTAMINAÇÃO POR *Listeria* spp. E *Staphylococcus* spp. EM LEITE IN NATURA

Karina Hissae Sekine (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cristiane Mengue Feniman Moritz (Orientadora), e-mail: karina.hsekinegmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Tecnologia
/Umuarama, PR

Ciência Agrárias – 50000004
Ciência e Tecnologia de Alimentos – 50700006

Palavras-chave: mastite bovina, resistência antimicrobiana, *Staphylococcus* spp.

Resumo:

O leite é um alimento com de amplo consumo na nutrição humana. Contudo, ao lado da indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco de o leite veicular micro-organismos patogênicos. Selecionou-se uma propriedade rural no município de Iporã/PR com rebanho leiteiro de 28 animais e foram coletadas amostras de leite de cada vaca para o isolamento de *Staphylococcus* spp. e Contagem de Células Somáticas (CCS). A partir das linhagens microbianas isoladas de amostras com CCS que evidenciavam mastite clínica e subclínica foi realizado o teste de antibiograma. Em todas as amostras houve o crescimento de colônias características de estafilococos em Baird Parker Agar, sendo confirmada a presença de *S. aureus* em 16,3% das colônias isoladas. Das 28 amostras de leite, foram detectadas mastite clínica e subclínica em 3 e 7 amostras, respectivamente, sendo realizado o antibiograma para as linhagens isoladas dessas amostras. Em 50% dessas linhagens isoladas detectou-se a resistência à apenas um antibiótico testado. Além do monitoramento da incidência da mastite no rebanho deste estudo fossem aplicadas as medidas preventivas e a terapêutica adequada com base no antibiograma realizado, poderia ser uma estratégia eficiente para o controle da doença nos animais acometidos e contribuiria para limitar a disseminação da doença entre o rebanho.

Introdução

Da grande variedade de alimentos disponíveis à população, o leite destaca-se pela sua rica constituição, sendo em muitos casos utilizado como o principal alimento na dieta infantil. Dessa maneira, espera-se que o leite a ser consumido apresente boas características microbiológicas.

A composição química do leite torna-o um alimento altamente perecível, com características intrínsecas ideais para o desenvolvimento de micro-

organismos, como elevado valor nutricional, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade. O leite obtido de animais sadios e com cuidados higiênico-sanitários adequados, durante a ordenha e na manipulação posterior, apresenta uma quantidade relativamente pequena de micro-organismos contaminantes e menor probabilidade da presença de patógenos. No entanto, quando o animal apresenta um quadro clínico de infecção, pode ocorrer a contaminação do leite pelo agente infeccioso, como o que ocorre nos animais acometidos por mastite.

Além da contaminação do leite pelo agente patogênico, a mastite bovina é uma doença onerosa que afeta a rentabilidade da indústria do leite, devido à redução da produção de leite pelo animal acometido (VILLA-ARCILA et al., 2017). Também é considerada uma doença complexa, ocasionada por uma variedade de patógenos que diferem na malignidade, além das diversas interações, tais como hospedeiro, ambiente e micro-organismos (FONTANA et al, 2012).

O estudo teve o objetivo de identificar a contaminação por *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. em leite *in natura*, relacionar com a contagem de células somáticas do leite e determinar a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados.

Materiais e métodos

Foi selecionada uma propriedade rural nas proximidades do município de Iporã/PR com rebanho leiteiro de 28 animais. Foram retiradas amostras de leite de cada vaca em frascos estéreis com volume aproximado de 70 mL, sendo descartados os primeiros jatos de leite de cada teto e a coleta realizada logo a seguir.

Para o isolamento de linhagens de *Listeria* spp. foi realizada a etapa de enriquecimento seletivo com Caldo de Enriquecimento de *Listeria* (LEC) com uma alíquota de 25 mL. Após incubação foi realizada a semeadura em placas de Ágar Oxford (OXA) e Ágar PALCAM.

Outra alíquota de 25 mL foi retirada para o preparo de diluições seriadas (até 10^{-3}) para o isolamento de *Staphylococcus* spp. a partir da semeadura em *Baird Park Agar* (BP) e diferenciação de estafilococos coagulase positiva e negativa (teste de coagulase, além dos testes de catalase e DNAase).

Para o diagnóstico de leite mastítico foi utilizado o analisador de Contagem de Células Somáticas (CCS) que faz a correlação da viscosidade do leite após adição de um reagente específico, conforme o método de *Wisconsin Mastitis Test* (WMT). A faixa de medição foi de 90.000 a 1.500.000 células.mL⁻¹.

Foram utilizados os seguintes limites para a CCS: animal saudável: até 200.000 células.mL⁻¹; animal com mastite subclínica: entre 200.000 e 500.000 células.mL⁻¹; animal com mastite clínica: acima de 500.000 células.mL⁻¹.

As linhagens isoladas em BP, provenientes de vacas consideradas com mastite clínica e subclínica pela CCS, foram repicadas para a obtenção de cultura pura em placas de PCA, sendo posteriormente repicadas em *Brain*

Heart Broth (BHI) contendo 10% de glicerina. Após incubação a 37°C por 24 horas, alíquotas de 200 µL foram dispostas em microtubos para serem congeladas a -20°C e posterior realização de coloração de GRAM e teste de antibiograma com os antibióticos: Ampicilina 10 mcg (AMP), Azitromicina 15 mcg (AZI), Cefazolina 30 mcg (CFZ), Ciprofloxacina 5 mcg (CIP), Clindamicina 2 mcg (CLI), Cloranfenicol 30 mcg (CLO), Gentamicina 10 mcg (GEN), Tetraciclina 30 mcg (TET) e Vancomicina 30 mcg (VAN).

Resultados e discussão

Para todas as 28 amostras não houve crescimento de colônias nos meios OXA e PALCAM, seletivos para *Listeria monocytogenes*. No entanto, houve crescimento de colônias no meio BP para todas as amostras analisadas, indicando a presença de *Staphylococcus* spp.

As colônias selecionadas nas placas de BP foram classificadas de acordo com as características que apresentavam, sendo consideradas como Tipo 1 (pequena, regular, negra e brilhante) e Tipo 2 (grande, irregular, cor marrom escuro e opaca). De um total de 43 colônias isoladas, 26 foram classificadas como Tipo 1 e 17 como Tipo 2.

Nos testes bioquímicos foi possível confirmar que aproximadamente 16,3% (7 amostras) das colônias isoladas tratavam-se de *Staphylococcus aureus*, considerando o resultado positivo para os testes de coagulase, catalase e DNase. Das 43 colônias isoladas, 10 (23,3%) eram coagulase positiva e 33 (76,75%) coagulase negativa.

Oliveira et al. (2011) afirma que estafilococos coagulase negativo (SCN) são frequentemente isolados de rebanhos leiteiros que possuem associação com casos de mastite clínica de intensidade leve ou mastite subclínica.

Luheis, Hernandez e Troncarelli (2010) avaliaram a frequência de casos de mastite em rebanho de 159 ovelhas. Das 309 amostras de estudo, 97 resultaram em *Staphylococcus* spp. Além disso, os autores determinaram que dentre as 97 amostras, em 27,5% isolaram estafilococos coagulase negativo e em 3,9% isolaram estafilococos coagulase positivo. Os autores salientam que a ordenha a ser realizada deve possuir extrema higiene desde o pré ao pós dipping, assim havendo o controle de riscos de infecção.

Conforme a contagem de CCS foi possível evidenciar o quadro de mastite clínica ou subclínica dos animais, estando 10 (35,7%) animais afetados em um rebanho de 28 animais no total.

Apesar das medidas de controle da mastite, como a desinfecção dos tetos pré e pós-ordenha e as boas prática de ordenha, as vacas com mastite necessitam de intervenção antibiótica. Moritz e Moritz (2016) ressaltaram a importância da escolha de um antimicrobiano eficaz para o tratamento da mastite, evitando a possibilidade de resistência microbiana no rebanho.

Conclusões

Constatou-se que 35,7% do rebanho bovino leiteiro em estudo estava acometido por mastite clínica ou subclínica. Dos isolados microbianos a

partir do leite coletado, foi possível averiguar a resistência à apenas um antibiótico testado em 50% das linhagens isoladas. A escolha de um antibiótico baseada em um antibiograma permite um tratamento eficaz da mastite e dificulta a possibilidade de multirresistência do micro-organismo patogênico, contribuindo para se evitar a disseminação da doença em todo o rebanho.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

FONTANA, V. D. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; FONTANA, C. A. P.; LEITE, C. Q. F.; STELLA, A. E., Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenadores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 469-476, 2012.

LUCHEIS, S. B.; HERNANDES, G. S.; TRONCARELLI, M. Z., Monitoramento microbiológico da mastite ovina na região de Bauru, SP. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 77, n. 3, p. 395-403, 2010.

MORITZ, F.; MORITZ, C. M. F. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Revista de Ciências Veterinárias e Saúde Pública**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2016.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D., Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

VILLA-ARCILA, N, A.; SANCHEZ, J.; RATTO, M. H.; RODRIGUEZ-LECOMPTÉ, J. C.; DUQUE-MADRID, P. C.; SANCHEZ-ARIAS, S.; CEBALLOS-MARQUEZ, A., A associação entre a mastite subclínica em torno de parto e desempenho reprodutivo em pastagem de vacas leiteiras. **Ciência Reprodução Animal**, v. 185, p. 109-117, ano 2017.