

**ULISSES IMIANOVSKY**

**DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM LEITE MATERNO  
PROVENIENTE DE BANCO DE LEITE HUMANO**

**Florianópolis – SC  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM LEITE MATERNO  
PROVENIENTE DE BANCO DE LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadoras: Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista  
Profa. Dra. Mercedes Gabriela Ratto Reiter

**ULISSES IMIANOVSKY**

**Florianópolis – SC  
2007**

*A todos os seres de luz dos universos*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista, pela orientação e por ter me acolhido em condições tão incomuns...

À Profa. Dra. Mercedes Gabriela Ratto Reiter, pela orientação, paciência, amizade e lições para a vida.

A Frank Reiter, pela amizade e por ter “cedido” sua esposa nos finais de semana, feriados e fora dos horários de trabalho.

À FAPESC pelo apoio financeiro.

À toda a equipe da BioMérieux do Brasil, em especial à Fábio Hasegawa, pela atenção e presteza na resolução de problemas e dúvidas.

Às monitoras Helóisa e Tatiana, bem como aos estagiários do Laboratório de Microbiologia Cristiane, Djonice, Gisele, Karina, Tanira e Hemílio.

Às funcionárias do Banco de Leite Humano de Blumenau e do Lactário do Hospital Santo Antônio, por terem aceito um “estranho” em seus ambientes de trabalho.

À “tia” Gaby e “tio” Carlos, pelo carinho e amizade, com os quais sempre me receberam.

À meus pais, pelo apoio e compreensão dispensados.

À Harriet, minha namorada, pelo amor, paciência e ajuda, que sem os quais este projeto teria sido impossível.

À Deus.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	2
<b>1 Revisão bibliográfica</b> .....	2
1.1 Leite Materno.....	3
1.2 Bancos de Leite Humano (BLH's).....	6
1.3 Biota contaminante.....	7
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.5 Enterotoxinas estafilocócicas (SET's).....	10
<b>2 Referências bibliográficas</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	18
Enterotoxinas estafilocócicas em leite materno: Revisão.....	19
Resumo.....	19
Revisão.....	20
Referências.....	25
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	28
Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em leite materno proveniente de Banco de Leite Humano.....	29
Resumo .....	29
Introdução .....	30
Métodos .....	32
Resultados e discussão .....	33
Conclusão.....	38
Referências .....	38
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	45

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 01: Concentração das principais proteínas presentes no leite.....	04
--	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 01: Valores médios das contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em meio BP-RPF, nas três etapas de processamento do leite materno.....	43
Tabela 02: Identificação das cepas isoladas do meio BP RPF de amostras de leite cru, pasteurizado e coletado no lactário.....	44

## RESUMO

O leite materno é o alimento ideal ao bebê humano, porém, devido a diversos fatores, não são todas as mães que podem amamentar, sendo necessários, assim, os Bancos de Leite Humano, que são centros de coleta, tratamento e distribuição de leite materno. Este trabalho objetivou a verificação da presença de *S. aureus*, bem como suas toxinas, em leite materno cru (doado pelas mães e que não sofreu nenhum processamento), pasteurizado e descongelado no lactário do hospital. O Capítulo 1 compreende uma pequena revisão bibliográfica que abrange o assunto trabalhado. O Capítulo 2 apresenta uma revisão sobre enterotoxinas estafilocócicas presentes em leite materno, sendo que esta revisão foi enviada à Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil. Os dados obtidos, bem como as metodologias utilizadas, estão relatados no Capítulo 3, que foi elaborado segundo o modelo da *Journal of Human Lactation*.



## ABSTRACT

Breast milk is the ideal food for the human baby, although, due to several factors, some mothers cannot breastfeed. Because of that, Human Milk Banks, which are center that collect, treat and distribute donor milk, are necessary. The aim of this work was to verify the presence of *S. aureus*, as well as its enterotoxins, in samples of raw milk (which was donated by the mothers and wasn't subjected to any treatment but freezing) pasteurized milk and milk that was thawed in the hospital. Chapter 1 presents a small review that embraces the worked subject. Chapter 2 contains a review about staphylococcal enterotoxins that can be found in breast milk. The contents of this chapter were sent to the *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. The data gathered, as well as the methods used in this project, are referred in Chapter 3, which was elaborated according to the instructions of the Journal of Human Lactation.

## 1. INTRODUÇÃO

A importância do leite materno como principal alimento para o recém-nascido vem crescendo à medida que se conhecem suas propriedades, assim como as necessidades nutricionais e fisiológicas do metabolismo da criança, trazendo também importantes vantagens para as mães (Brasil, 1997; Brasil, 1998).

Nos países em desenvolvimento o aleitamento materno é de grande importância para a sobrevivência de crianças nos primeiros anos de vida. Estima-se que cerca de 1 milhão de crianças morrem a cada ano de diarreia, infecções respiratórias agudas e outras doenças infecciosas, porque não foram adequadamente amamentadas ao peito (Brasil, 1997).

Para atender a necessidade de lactentes clinicamente impossibilitados de serem amamentados pela própria mãe, tornou-se crescente a necessidade de leite materno para suprir a demanda, porém exigiu-se a utilização de técnicas adequadas de coleta, processamento e controle de qualidade. No Brasil, a legislação que regulamenta a implantação e o funcionamento de Bancos de Leite Humano (BLH's) é a Portaria nº 322/88 (Brasil, 1998).

O controle de qualidade tem como objetivo que um produto mantenha suas propriedades desde a coleta até seu consumo, a baixo custo e com o mínimo de risco para o consumidor. Dessa forma, caso o leite materno seja coletado e armazenado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, o produto pode apresentar microrganismos, reduzindo o valor nutricional e a qualidade do leite (Novak, 2001).

Entre os microrganismos que podem estar presentes no leite materno, encontra-se o *Staphylococcus aureus*. Em 1999, Novak pesquisou a presença de *S. aureus* resistentes à meticilina em leite materno e detectou que certas cepas, além de apresentarem resistência ao referido antimicrobiano, cresciam eficientemente no colostro humano, sendo também verificado que estas liberavam enterotoxinas no leite.

A pesquisa de *S. aureus*, bem como de suas toxinas, faz-se necessária uma vez que as crianças envolvidas no consumo de leite humano ordenhado (LHO) normalmente são muito jovens e com um sistema imunológico não completamente desenvolvido, o que pode ocasionar vários problemas de saúde até mesmo a morte (Novak, 1999). Assim, este trabalho tem como finalidade a pesquisa de *S. aureus* e suas toxinas em amostras de leite materno provenientes do Banco de Leite Humano de Blumenau.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de promoção do aleitamento materno: normas técnicas**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 52p.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 48p.
3. NOVAK, F.R. **Ocorrência de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 102 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.
4. NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 713-717, 2001.

## **CAPÍTULO 1**

### **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Leite Materno

O leite humano é espécie-específico, sendo o alimento ideal ao bebê humano (Brasil, 1997; Brasil, 1998; Heikkilä e Saris, 2003; Bortolozzo et al., 2004; Gartner et al., 2005; Rechtman et al., 2006). Todas as formulações substitutas diferem dele, tornando-o superior para a alimentação dos recém-nascidos (Sarkar, 2004; Gartner et al., 2005).

Como vantagens do leite materno, podem-se citar:

- Nutricional e digestivamente completo (Brasil, 1997; Vinha, 1999; Rozolen et al., 2006);
- Quando consumido diretamente do seio, encontra-se na temperatura certa (Vinha, 1999);
- Facilmente digerível, sendo mais rapidamente absorvido pelo bebê (Brasil, 1997; Vinha, 1999; Bortolozzo et al., 2004; Rechtman et al., 2006);
- A presença de anticorpos e fatores anti-infecciosos protege contra infecções, principalmente diarreias e pneumonias (Brasil, 1997; Vinha, 1999; Heikkilä e Saris, 2003; Salvini et al., 2004; Gartner et al., 2005; Isaacs, 2005; Rouse et al., 2005);
- Devido à presença de fatores prebióticos, promove o crescimento de bactérias que impedem a instalação de microrganismos patogênicos no intestino da criança (Bengmark, 2003; Salvini et al., 2004; Magne et al., 2006);
- Diminui as taxas da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI) e reduz a incidência de diabetes melitus, insulina dependente ou não (Gartner et al., 2005);
- Facilita a eliminação de mecônio, diminuindo o risco de icterícia e protegendo contra obstipação (Brasil, 1997);
- O ato de amamentar promove supressão de dor no lactente (Gartner et al., 2005);
- O aleitamento afeta positivamente o desenvolvimento cognitivo das crianças (Anderson et al., 1999; Gartner et al., 2005);
- Crianças que receberam leite materno nos primeiros meses de vida possuem timo maior (Pabst et al., 1997);
- Aumenta o laço afetivo mãe-filho (Brasil, 1997).

A Tabela 01 apresenta a concentração das principais proteínas do leite humano frente à do leite de vaca.

Tabela 01: Concentração das principais proteínas presentes no leite bovino e humano.

Proteína	Concentração (g/L)	
	Bovino	Humano
Caseínas totais	26,0	2,7
$\alpha$ -caseína	13,0	
$\beta$ -caseína	9,3	
$\kappa$ -caseína	3,3	
Proteínas totais do soro	6,3	67,3
$\beta$ -lactoglobulina	3,2	
$\alpha$ -lactoalbumina	1,2	1,9
Imunoglobulinas (A, M e G)	0,7	1,3
Albumina do soro	0,4	0,4
Lactoferrina	0,1	1,5
Lactoperoxidase	0,03	
Lisozima	0,0004	0,1
Diversas	0,8	1,1

**Fonte:** Séverin e Wenshui (2005).

Os ácidos graxos presentes no leite humano contribuem para suas propriedades antimicrobianas (Rouse et al., 2005). Segundo Isaacs (2005) estes ácidos graxos de início somente apresentam atividade antibiótica *in vivo* ao serem digeridos no trato gastrointestinal, sendo o ácido oléico o principal ácido graxo com atividade antimicrobiana liberado pelo leite materno. No entanto, as características antimicrobianas dos ácidos graxos não são obtidas isoladamente. Por exemplo, *Escherichia coli* é inativada por misturas de ácidos graxos de cadeia média, mas é resistente a ácidos graxos de cadeia longa. Também existem interações entre os ácidos graxos e peptídeos e outros compostos que, de forma aditiva e sinérgica, proporcionam esta característica antimicrobiana.

O leite humano é muito rico em oligossacarídeos não digeríveis (somente o leite de elefanta os possui em maiores concentrações). Acredita-se que certos oligossacarídeos, que possuem similaridades estruturais com glicoconjugados da membrana de células imunomodulatórias, sejam responsáveis pela proteção conferida aos lactentes contra inflamações e infecções. Além disso, estes oligossacarídeos não digeríveis agem como prebióticos,

estimulando o crescimento de uma microbiota não patogênica no intestino (Bengmark, 2003). Segundo Salvini et al. (2004) e Sarkar (2004), o leite materno é um exemplo natural de alimento que contém prebióticos. Em crianças alimentadas somente com leite materno, *Bifidobacterium* spp. eram dominantes na biota intestinal. No entanto, crianças alimentadas com fórmulas infantis apresentavam microbiota diversa, constituída por *Bacterioides*, enterobactérias, enterococos, clostrídios, além de *Bifidobacterium* spp. (Salvini et al., 2004; Magne et al., 2006).

Além das proteínas principais, existem pequenas quantidades de outras proteínas e peptídeos, que apresentam diversas atividades fisiológicas, entre elas, a hormonal (Séverin e Wenshui, 2005). Svanborg et al. (2005) citam, por exemplo, que além do papel na síntese de lactose, a  $\alpha$ -lactoalbumina também apresenta atividade inativadora de células neoplásicas. Guillén et al. (2002) citam diversas funções fisiológicas atribuídas à lactoferrina presente no leite humano, entre elas: amplo espectro antimicrobiano, atividades antiinflamatórias e imunorregulatórias. A lactoferrina pode ainda ligar-se a íons ferro em áreas de inflamação, indisponibilizando-o para o metabolismo microbiano. Segundo Bortolozo et al. (2004), estudos clínicos demonstram uma diminuição nos casos de infecções nos bebês de baixo peso que foram alimentados com leite humano.

O leite apresenta composição diferenciada dependendo do estágio de lactação (Bortolozo et al., 2004). Assim, o leite produzido nos primeiros dias após o parto é o colostro, sendo este substituído pelo leite de transição e, por fim, pelo leite branco (Brasil, 1997; Vinha, 1999).

O colostro é produzido, em média, até o sétimo dia após o parto (Brasil, 1998). Possui coloração amarelada e é mais grosso (densidade de 1,050 g/cm<sup>3</sup>) e produzido em menor quantidade do que os outros leites (Brasil, 1997; Vinha, 1999). O colostro é muito mais rico em imunoglobulinas, peptídeos com ação antimicrobiana e fatores de crescimento do que o leite branco. A lactoferrina e Imunoglobulina A (IgA) secretória, juntas, somam 65% das proteínas encontradas no colostro humano (Sarkar, 2004)

O leite de transição, como o nome diz, trata-se de uma mistura entre o colostro e o leite branco, sendo prontamente substituído por este.

O leite branco, de acordo com Almeida (1986), possui pH próximo à neutralidade, pouco odor e sabor adocicado. Apesar de parecer “fraco”, este leite supre todas as necessidades nutricionais do lactente nos 4 a 6 primeiros meses de vida (Brasil, 1997; Vinha, 1999). Ainda, 20% de todas suas proteínas apresentam atividade antimicrobiana (Sarkar, 2004).

A produção de leite branco ocorre por ação da prolactina, sendo que para sua formação, células secretoras dos alvéolos retiram do sangue água, partículas de proteínas, glóbulos de

gordura, lactose, sais minerais, vitaminas, anticorpos e outras substâncias importantes (Vinha, 1999).

Além de variar com o tempo decorrido desde o parto, o leite também apresenta estrutura diferente durante a mamada. Assim, inicialmente, este apresenta aspecto claro, sendo rico em proteínas, lactose, vitaminas, água e sais minerais. Mais para o final da mamada, o leite apresenta maior valor energético, devido a maior concentração de gordura. Desta forma, o total esvaziamento de uma mama é importante para que o lactente absorva todos os nutrientes necessários à sua formação e em quantidades adequadas (Brasil, 1997).

Estima-se que a cada ano cerca de 1 milhão de crianças de países em desenvolvimento morram vítimas de diarreia, infecções respiratórias agudas e outras doenças infecciosas devido ao fato de não terem sido devidamente amamentadas ao peito (Brasil, 1997). O problema da má nutrição é tão grave que a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que mães portadoras de HIV, que vivem em países em desenvolvimento e não possuem recursos para aquisição de fórmulas infantis, dêem leite materno para seus filhos. No entanto, é recomendado o aquecimento do leite de modo a inativar, pelo menos em parte, a carga viral (Israel-Ballard et al., 2006). Esta prática, no entanto, não é aconselhada em países desenvolvidos, como os Estados Unidos (Warner e Sapsford, 2004; Gartner et al., 2005)

## **1.2 Bancos de Leite Humano (BLH's)**

Apesar dos benefícios relacionados ao aleitamento, muitas mães não podem, ou não querem, amamentar seus filhos (Rechtman et al., 2006). Assim, para atender a necessidade de lactentes impossibilitados de serem amamentados pela própria mãe, tornou-se crescente a necessidade de leite humano ordenhado para suprir a demanda, porém exigiu-se a utilização de técnicas adequadas de coleta, processamento e controle de qualidade (Brasil, 1998). Segundo Almeida (1999), os BLH's são um dos órgãos mais importantes em favor da amamentação. Estes apresentam os seguintes objetivos:

- Coleta de leite materno para manutenção de estoques regulares de modo a suprir as necessidades dos lactentes;
- Distribuição do leite para maternidades e hospitais infantis, sempre respeitando a ordem de prioridade;
- Orientação às doadoras, no caso da coleta domiciliar;



- Melhores condições de atendimento médico, nutricional e social às mães doadoras e seus filhos, bem como atendimento de recém-nascidos prematuros, de baixo peso, crianças imunologicamente deficientes e alérgicas a outro tipo de leite.

Os BLH's foram criados no Brasil como uma forma de frear o desmame precoce, que ocorria, principalmente, pela substituição do leite materno por fórmulas comerciais (Almeida, 1999). O Brasil possui a maior rede de BLH's do mundo, contando em 1º de agosto de 2007 com 185 bancos de leite e 17 postos de coleta cadastrados (Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, 2007).

De modo a garantir a qualidade do leite fornecido às crianças, as doadoras devem ser saudáveis e ter uma quantidade de secreção láctea superior à necessidade de seu filho, além de doar o excedente por livre e espontânea vontade (Brasil, 1998; Galhardo et al., 2002).

Existem três técnicas de ordenha (extração) do leite: a manual, com bomba e mecanizada. O tipo de técnica utilizada pode estar diretamente relacionada com a contaminação do leite materno. O método manual, por exemplo, mesmo sendo mais simples de todos, pode vir a causar fissuras nas mamas da doadora e se esta não possuir o hábito de lavar as mãos antes de coletar o leite, pode contaminá-lo (Brasil, 1997).

Qualquer que seja o tipo de extração utilizado, esta deve sempre ser precedida de limpeza das mãos (lavagem com água e sabão) e o material que irá receber o leite deve ser esterilizado. A limpeza é muito importante, pois, devido ao fato da pele humana conter inúmeros microrganismos, esta pode causar contaminação secundária do leite (Brasil, 1997).

Uma vez ordenhado, o leite materno pode ser armazenado por até 24 horas sob refrigeração ou por até 15 dias caso congelado (Martins Filho, 1987; Brasil, 1998). Atualmente, o uso de leite humano não tratado, ou cru, é praticamente inexistente. Uma exceção seria o que ocorre na Alemanha, onde a saúde das doadoras é monitorada pelos funcionários do banco de leite a cada 2 meses (Tully et al., 2001).

O controle de qualidade tem como objetivo obter um produto cuja qualidade permaneça desde a coleta até seu consumo, a baixo custo e com o mínimo de risco para o consumidor. Dessa forma, caso o leite humano ordenhado seja coletado e armazenado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, o produto pode apresentar microrganismos, reduzindo o valor nutricional e a qualidade do leite (Novak, 2001).

### 1.3 Biota contaminante

Da mesma forma que o leite materno constitui um alimento ideal para lactentes, uma vez que a sua composição apresenta todos os nutrientes necessários, este pode constituir um excelente meio de cultura para os microrganismos, assim que esgotarem os fatores de defesa antimicrobiana intrínsecos (Almeida, 1986; Jay, 1994, Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, 2004; Rozolen et al., 2006).

A microbiota do leite pode ainda ser classificada quanto a sua patogenicidade, em normal (ou saprófita) e patogênica. A normal ou saprófita impede a instalação de microrganismos patogênicos no organismo da criança (Brasil, 1998). Bactérias da biota normal, juntamente com as do grupo coliformes, *E. coli*, bolores e leveduras, podem ser consideradas como microrganismos indicadores. Assim, quando presentes, podem indicar ocorrência de contaminação fecal, presença de patógenos ou estágio de deterioração do leite. Também podem indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento ou armazenamento (Rozolen et al., 2006).

Coproculturas de crianças amamentadas exclusivamente com leite materno indicam a presença de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum* e *B. infantis*). Já as crianças desmamadas, apresentam predomínio de enterobactérias (Brasil, 1998). Reviriego et al. (2005) citam que, normalmente, um pequeno espectro de bactérias gram positivas é isolado do leite materno. Estas incluem estafilococos, estreptococos, micrococos, lactobacilos e enterococos. O fato dos mesmos grupos de bactérias serem isolados a partir do leite de mulheres sadias de diferentes áreas geográficas sugere que estes constituam a microbiota natural deste fluido.

Os microrganismos patogênicos merecem destaque, principalmente quando se trata de leite materno. Manipulação ou procedimentos higiênico-sanitários inadequados podem acabar contaminando o leite, trazendo muitos prejuízos ao lactente (Brasil, 1998). Estas formas de contaminação geralmente refletem condições precárias de higiene durante a produção, armazenagem e mesmo durante o manuseio doméstico (Franco e Landgraf, 2003). No caso de bebês prematuros, infecções ocasionadas por microrganismos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp.) transmitidos pelo leite humano já foram relatadas (Warner e Sapsford, 2004).

Gava (1985), Franco e Landgraf (2003) e Pelczar (1997) citam que as doenças de origem alimentar, associadas a microrganismos, são divididas em duas categorias: as intoxicações alimentares e as infecções alimentares.

As intoxicações ocorrem quando o alimento ingerido possui toxinas que foram produzidas por microrganismos durante sua preparação. Deste modo, o aparecimento de um quadro de enfermidade não está relacionado com a ingestão de células viáveis, mas sim com a ingestão de alguma toxina (Gava, 1985; Franco e Landgraf, 2003; Pelczar, 1997). Um exemplo seria a ingestão da toxina produzida por *S. aureus*. Esta toxina é termorresistente e, assim, durante o processo de cozimento a bactéria pereceria, mas ela permanece ativa. Deste modo, quem consumisse este alimento adoeceria mesmo não havendo bactérias viáveis presentes nele. A doença seria causada pela toxina (Jay, 1994; Franco e Landgraf, 2003; Pelczar, 1997).

#### 1.4 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* (de *staphyle* = uva) foi originalmente isolado do pus humano por Robert Koch em 1878, sendo que em 1884, Rosemberg caracterizou o *S. albus* e o *S. aureus* devido a características de pigmentação que estas espécies apresentam (Evangelista, 1992). Até 1974 o gênero contava com apenas estas duas espécies, porém estudos de quimiotaxonomia e hibridização de ácido nucléico revelaram a existência de 28 espécies e sete subespécies (Logan, 1994).

*S. aureus* são cocos Gram-positivos não-móveis, aparecendo sozinhos, em pares ou formando tétrades ou agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Também são catalase positivos e coagulam o plasma, transformando a protrombina em trombina, ativando a formação de fibrina a partir do fibrinogênio, ou seja, são coagulase positivos. Esta característica é utilizada como um importante marcador de patogenicidade, que diferencia esta espécie das demais (Krieg et al., 1984; Evangelista, 1992; Siqueira, 1995; Trabulsi, 1999; Franco e Landgraf, 2003). Entretanto, nem todas as cepas coagulase positivas produzem toxinfecções alimentares (Jay, 1994).

De acordo com Krieg et al. (1984), cepas incomuns que possuem cápsulas ou pseudocápsulas podem apresentar maior virulência do que cepas desprovidas deste invólucro. Já Trabulsi (1999), cita que os seguintes fatores contribuem para a sua virulência: presença de cápsula; peptidoglicano; ácidos teicóicos; proteína A e adesinas.

Anaeróbios facultativos, crescem mais rapidamente sob condições aeróbias. A maioria das cepas desenvolve-se bem em meios contendo concentração de NaCl por volta de 10% e em temperaturas entre 18 e 40°C (Krieg et al., 1984; Franco e Landgraf, 2003; Tortora et al., 2000). São relativamente susceptíveis ao calor e a agentes desinfetantes. Deste modo, a presença de *S. aureus* ou de suas toxinas em alimentos processados ou em equipamentos de processamento, normalmente indica problemas de higiene na fabricação ou manipulação (*Bacteriological Analytical Manual Online*, 2007).

É o agente mais comum de infecções piogênicas (localizadas tanto na pele como em regiões mais profundas) além de causar vários tipos de intoxicações, a partir de um processo infeccioso, síndrome da pele escaldada, impetigo bolhoso, ou não, como intoxicação alimentar ou síndrome do choque tóxico (Evangelista, 1992; Trabulsi, 1999; Tortora et al., 2000; Sousa e Lencastre, 2004). Segundo Novak et al. (2000), *S. aureus* emergiu recentemente como o mais importante patógeno humano.

Amplamente distribuído na natureza, *S. aureus* faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves (Evangelista, 1992; Logan, 1994; Trabulsi, 1999; Forsythe, 2002). Em humanos, 10 a 40% apresentam esta bactéria na pele, sendo que ela se localiza, principalmente, na vulva (60% das mulheres) e fossas nasais (50 a 70% dos que trabalham em hospitais) (Roitman et al., 1988; Evangelista, 1992; Trabulsi, 1999). É também encontrado na orofaringe de 35 a 40% dos seres humanos e na boca e saliva em cerca de 10 a 35% (Serafini et al., 2003; Fagundes e Oliveira, 2004),

Segundo Fetherston (2003), *S. aureus* é o organismo predominante nos quadros de mastite. Sua presença, porém, no leite materno pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados (Serafini et al., 2003; Fagundes e Oliveira, 2004). Além disso, o leite materno pode abrigar cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (Sousa e Lencastre, 2004).

A maior preocupação quanto à sua presença, no entanto, incide sobre a ocorrência de cepas que produzem toxinas, que são resistentes à pasteurização (Serafini et al., 2003; Fagundes e Oliveira, 2004).

### 1.5 Enterotoxinas estafilocócicas (EST's)

As enterotoxinas estafilocócicas (EST's) estão entre as diversas proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons) sintetizadas por *S. aureus*. A intoxicação alimentar causada pelas EST's é provocada pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado e não mantido sob controle térmico apropriado (Trabulsi, 1999; Forsythe, 2002).

Segundo Novak (1999), as enterotoxinas estafilocócicas são proteínas hidrossolúveis e que apresentam características de estrutura, composição de aminoácidos e atividades farmacológicas semelhantes. No entanto, possuem resistência a enzimas proteolíticas e propriedades imunológicas distintas. Assim, estas são divididas em cinco grupos imunológicos distintos segundo Novak (1999), Trabulsi (1999) e Forsythe (2002): A, B, C, D e E. No entanto, Jørgensen et al. (2005) citam que, atualmente, são conhecidos 18 grupos (SEA, SEB, SEC [subgrupo SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>], SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU), porém somente as primeiras 8 foram associadas a surtos de intoxicação alimentar.

Diversos fatores influem na produção das EST's, como por exemplo, presença de microbiota competidora, atividade de água, temperatura, pH, concentração de cloreto de sódio e tensão de O<sub>2</sub>. Cada uma destas características apresenta valores específicos para cada EST (Novak, 1999).

Os sintomas da intoxicação variam conforme a sensibilidade do indivíduo. Porém, normalmente, ocorrem náuseas, vômitos e cólicas abdominais. Quadros mais graves incluem fezes mucossangüinolentas, desidratação e choque (Novak, 1999).

As EST's unem-se, nos linfócitos T, ao MHC de classe II, agindo como superantígenos, pois estimulam a mitose de linfócitos e o MHC de classe II (Novak, 1999, Langley et al., 2005). Determinados fatores, como maior incidência de receptores para *S. aureus* em certas faixas etárias (como o antígeno de Lewis), infecções virais e o fumo (no caso de crianças, passivo), podem aumentar a ligação de *S. aureus* às células e, por conseqüência, produção de toxinas (Blackwell et al, 2002).

Estas toxinas são termoestáveis, podendo veicular-se mesmo por alimentos cozidos (Evangelista, 1992; Trabulsi, 1999; Forsythe, 2002). Segundo Novak et al. (2000), leite processado de forma inadequada pode permitir um aumento nas contagens de *S. aureus*,

possibilitando a produção de EST's, que podem suportar temperaturas de 100°C por até 30 minutos. Assim, o leite pasteurizado pode estar livre de microrganismos, mas conter EST's.

Em 1999, Novak pesquisou a presença de *S. aureus* resistentes à metilina em leite materno e detectou que certas cepas, além de apresentarem resistência ao referido antimicrobiano, cresciam eficientemente no colostro humano, sendo também verificado que estas liberavam enterotoxinas no leite.

Atualmente, as altas taxas de infecções adquiridas em hospitais por crianças recém-nascidas, principalmente as prematuras, são de grande preocupação dos profissionais de saúde. Diversos fatores críticos têm-se mostrados associados a este problema, sendo o alimento consumido por estas crianças, principalmente as fórmulas infantis e leite materno contaminados, o veículo principal de propagação de patógenos e metabólitos microbianos nestes quadros (Carneiro et al., 2004).

No caso do leite materno, a contaminação normalmente ocorre devido a infecções maternas e/ou colonização por bactérias oportunistas ou ainda por ordenha, manipulação ou armazenamento errôneos (Carneiro et al., 2004).

Zorgani et al. (1999) e Blackwell et al. (2002) relatam que em mais da metade dos casos da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI) toxinas estafilocócicas foram encontradas em amostras de tecidos das crianças mortas. Além disso, Blackwell et al. (2002) citam que as cepas isoladas de casos de SMSI produzem toxinas que variam conforme as áreas pesquisadas. Assim, na Escócia predominaram SEB e SEC, já na Hungria, o predomínio foi de SEA.

Blackwell et al. (2002) citam que a SMSI é assim diagnosticada quando ocorre morte inesperada da criança, não havendo histórico de doença que a justifique, além dos exames *post mortem* não identificarem uma causa da morte adequada. Apesar de todos os esforços, SMSI é ainda a principal causa de morte entre crianças de 1 semana e 1 ano de vida nos países industrializados. Em 86% das crianças que foram vitimadas pela SMSI, a presença de *S. aureus* foi detectada, enquanto que, em crianças saudáveis, esta percentagem é de 56%.

No entanto, a substituição do aleitamento materno, pelas fórmulas infantis e/ou leites de outras espécies que não a humana não é aconselhável. Esta substituição pode comprometer a saúde da criança, quer nos países desenvolvidos, com a ocorrência de doenças alérgicas e metabólicas, quer nos países em desenvolvimento, com o aumento da morbidade e mortalidade entre os menores de um ano (Nejar et al., 2004).

## 2. Referências bibliográficas

1. ALMEIDA, J. A. G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite**. 1986. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.
2. ALMEIDA, J. A. G. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999. 120p.
3. ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B.M.; REMLEY, D.T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr.**, v. 70, p. 525–535, 1999.
4. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>> Acesso em: 13 de abril de 2007.
5. BENGMARK, S. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 833–848, 2003.
6. BLACKWELL, C.C.; GORDON, A.E.; JAMES, V.S.; MACKENZIE, D.A.C.; MOGENSEN-BUCHANAN, M.; EL AHMER, O.R.; MADANI, O.M.; TÖRÖ, K.; CUSKAS, Z.; SÓTONYI, P.; WEIR, D.M.; BUSUTTIL, A. The role of bacterial toxins in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). **Int. J. Med. Microbiol**, v.291, p.561–570, 2002.
7. BORTOLOZO, E.A.F.Q.; TIBONI, E.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. **Rev Panam Salud Publica**, v.16, n.3, p. 1-12, 2004.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de promoção do aleitamento materno: normas técnicas**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 52p.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 48p.
10. CARNEIRO, L.A.M.; QUEIROZ, M.L.P.; MERQUIOR, V.L.C. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast milk. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.761–768, 2004.
11. EVANGELISTA, J. **Alimentos – um estudo abrangente**. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1992. 450p.
12. FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315–1320, jul-ago, 2004.
13. FETHERSTON, C. **Relationships between clinical descriptors and changes in the physiology of the lactating breast before, during and after non-inflammatory and inflammatory breast disorders**. Tese (Doutorado em Filosofia) – School of Biomedical and

- Chemical Sciences, Faculty of Life and Physical Sciences, University of Western Australia, Perth, 2003.
14. FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
  15. FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.
  16. GALHARDO, A. L. S. M.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Acidez *Dornic* como parâmetro de qualidade, em bancos de leite humano. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 16-27, 2002.
  17. GARTNER, L.M.; MORTON, J.; LAWRENCE, R.A.; NAYLOR, A.J.; O'HARE, D.; SCHANLER, R.J. Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496-501, 2005.
  18. GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 284p.
  19. GUILLÉN, C.; MCINNES, I.B.; VAUGHAN, D.M.; KOMMAJOSYULA, S.; VAN BERKEL, P.H.C.; LEUNG, B.P.; AGUILA, A.; BROCK, J.H. Enhanced Th1 Response to *Staphylococcus aureus* Infection in Human Lactoferrin-Transgenic Mice. **The Journal of Immunology**, p. 3950-3957, 2002.
  20. HEIKKILÄ, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 471-478, 2003.
  21. ISAACS, C.E. Human Milk Inactivates Pathogens Individually, Additively, and Synergistically. **J. Nutr.**, v. 135, p. 1286-1288, 2005.
  22. ISRAEL-BALLARD, K.; COUTSOUDIS, A.; CHANTRY, C.J.; STURM, A.W.; KARIM, F.; SIBEKO, L.; ABRAMS, B. Bacterial Safety of Flash-heated and Unheated Expressed Breastmilk during Storage. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 52, p. 399-405, 2006.
  23. JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.
  24. JØRGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 267-272, 2005.
  25. KRIEG, N. R.; HOLT, J. G.; *et al.* **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 4v.
  26. LANGLEY, R.; WINES, B.; WILLOUGHBY, N.; BASU, I.; PROFT, T., FRASER, J.D. The Staphylococcal Superantigen-Like Protein 7 Binds IgA and Complement C5 and Inhibits IgA-Fc<sub>RI</sub> Binding and Serum Killing of Bacteria. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 2926-2933, 2005.



27. LOGAN, N. A. **Bacterial Systematics**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 263p.
28. MAGNE, F.; HACHELAF, W.; SUAUA, A.; BOUDRAA, G.; MANGIN, I.; TOUHAMI, M.; BOUZIANE-NEDJADI, K.; POCHART, P. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 58, p. 563–571, 2006.
29. MARTINS FILHO, J. **Como e porque amamentar**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1987. 220p.
30. NEJAR, F.F.; SEGALL-CORRÊA, A.M.; REA, M.F.; VIANNA, R.P.T.; PANIGASSI, G. Padrões de aleitamento materno e adequação energética. **Cad. Saúde Pública**, v.20, n.1, jan-fev, 2004.
31. NOVAK, F.R. **Ocorrência de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 102 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.
32. NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; WARNKEN, M.B.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; HAGLER, A.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Human Milk. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 29-33, 2000.
33. NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Publica**, v. 17, n. 3, p. 713-717, 2001.
34. PABST, H. F.; SPADY, D. W.; PILARSKI, L. M.; CARSON, M. M.; BEELER, J. A.; KREZOLEK, M. P. Differential modulation of the immune response by breast-or-formula feeding infants. **Acta Paediatr**, v. 86, n. 12, p. 1291-1297, 1997.
35. PELCZAR, M. J. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 2v.
36. RECHTMAN, D.J.; LEE, M.L.; BERG, H. Effect of Environmental Conditions on Unpasteurized Donor Human Milk. **Breastfeeding Medicine**, v. 1, n. 1, p. 24-26, 2006.
37. **Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=238&sid=352>> Acesso em: 1º de agosto de 2007.
38. REDE NACIONAL DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT- 33.04: Rotulagem do Leite Humano Ordenhado Processado. Rio de Janeiro, 2004. 3p.
39. REVIRIEGO, C.; EATON, T.; MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; GASSON, M.J.; RODRÍGUEZ, J.M. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk. **J Hum Lact**, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2005.
40. ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L; R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 2v.

41. ROUSE, M.S.; ROTGER, M.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M.; SCHOLZ, M.; ANDREWS, J.; PATEL, R. In Vitro and In Vivo Evaluations of the Activities of Lauric Acid Monoester Formulations against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3187–3191, 2005.
42. ROZOLEN, C.D.A.C.; GOULART, A.L.; KOPELMAN, B.I. Is Breast Milk Collected at Home Suitable for Raw Consumption by Neonates in Brazilian Public Neonatal Intensive Care Units? **J Hum Lact**, v. 22, n. 4, p. 418-425, 2006.
43. SALVINI, F.; GRANIERI, L.; GEMMELLARO, L.; GIOVANNINI, M. Probiotics, Prebiotics and Child Health: Where Are We Going? **The Journal of International Medical Research**, v. 32, p. 97-108, 2004.
44. SARKAR, S. Therapeutic aspects of breast milk. **Nutrition & Food Science**, v. 34, n. 3, p. 108-112, 2004.
45. SERAFINI, A.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RODRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T.F.N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n.6, p.775-779, 2003.
46. SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 645–656, 2005.
47. SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 1995. 159p.
48. SOUSA, M.A.; LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 101-111, 2004.
49. SVANBORG, C; GUSTAFSSON, L.; BOIERS, C.; HALLGREN, O.; MOSSBERG, A.K.; PETTERSSON, J.; FISCHER, W.; ARONSSON, A. HAMLET kills tumor cells by apoptosis: structure, cellular mechanisms, and therapy. **J. Nutr.**, v. 135, p. 1299–1303, 2005.
50. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, Christine L; *et al.*, **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
51. TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.
52. TULLY, D.B.; JONES, F.; TULLY, M.R. Donor Milk: What's in It and What's Not. **J Hum Lact**, v. 17, p. 152-155, 2001.
53. VINHA, V. H. P. **O livro da amamentação**. São Paulo: CLR Balieiro, 1999. 91p.
54. WARNER, B.B.; SAPSFORD, A. Misappropriated Human Milk: Fantasy, Fear, and Fact Regarding Infectious Risk. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 4, n. 1, p. 56–61, 2004.

55. ZORGANI, A.A.; AL MADANI, O.; ESSERY, S.D.; BENTLEY, A.J.; JAMES, V.S.; MACKENZIE, D.A.C.; KEELING, J.W.; RAMBAUD, C.; HILTON, J.; BLACKWELL, C.C.; WEIR, D.M.; BUSUTTIL, A. Detection of pyrogenic toxins of *Staphylococcus aureus* in cases of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v.25, p.103–108, 1999.

## **CAPÍTULO 2**

### **Enterotoxinas estafilocócicas em leite materno: Revisão**

**Revisão enviada à Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**

## **Enterotoxinas estafilocócicas em leite materno: Revisão**

### **RESUMO**

O leite materno, devido à suas características intrínsecas, é um meio extremamente nutritivo para microrganismos. Dentre eles, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que além de produzir infecções no organismo humano, produz toxinas, muitas das quais são termorresistentes. Desta forma, o leite materno ordenhado que foi manipulado de forma errônea ou submetido à condições de armazenamento não favoráveis, pode não só conter o microrganismo em questão, mas também alguma de suas toxinas. Diversos estudos também fazem uma correlação entre toxinas de origem microbiana com a chamada Síndrome da Morte Súbita Infantil. Esta síndrome caracteriza-se pela morte repentina e sem explicação aparente de crianças saudáveis.

**Palavras-chave:** leite materno, *Staphylococcus aureus*, enterotoxina

## Revisão

O Brasil possui a maior rede de BLH's do mundo, contando em 1º de agosto de 2007 com 185 bancos de leite e 17 postos de coleta cadastrados (1).

Apesar dos benefícios relacionados ao aleitamento, muitas mães não podem, ou não querem, amamentar seus filhos (2). Assim, para atender a necessidade de lactentes impossibilitados de serem amamentados pela própria mãe, torna-se crescente a necessidade de leite humano ordenhado para suprir a demanda. Porém torna-se necessária a utilização de técnicas adequadas de coleta, processamento e controle de qualidade (3).

De modo a garantir a qualidade do leite fornecido às crianças, as doadoras devem ser sadias e ter uma quantidade de secreção láctea superior à necessidade de seu filho, além de doar o excedente por livre e espontânea vontade (3; 4).

Qualquer que seja o método de extração utilizado para a coleta do leite, esta deve sempre ser precedida de limpeza das mãos (lavagem com água e sabão) e o material que irá receber o leite deve ser esterilizado (5). Uma vez ordenhado, o leite materno pode ser armazenado por até 24 horas sob refrigeração ou por até 15 dias caso congelado (3; 6). Atualmente o uso de leite humano não pasteurizado é praticamente inexistente. Uma exceção seria o que ocorre na Alemanha, onde a saúde das doadoras é monitorada pelos funcionários do banco de leite a cada dois meses (7).

O controle de qualidade tem como objetivo obter um produto cuja qualidade permaneça desde a coleta até seu consumo, a baixo custo e com o mínimo de risco para o consumidor (8). Da mesma forma que o leite materno constitui um alimento ideal para lactentes, uma vez que a sua composição apresenta todos os nutrientes necessários, este pode constituir um excelente meio de cultura para os microrganismos, assim que esgotarem os fatores de defesa antimicrobiana intrínsecos (1; 9; 10; 11).

Os microrganismos patogênicos presentes no leite materno merecem destaque, pois a manipulação ou procedimentos higiênico-sanitários inadequados podem contaminar o leite, trazendo muitos prejuízos ao lactente (3). No caso de bebês prematuros, infecções ocasionadas por microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. que foram transmitidos pelo leite humano já foram relatadas (12).

Segundo Fetherston (13), *S. aureus* é o organismo predominante nos quadros de mastite. Sua presença, porém, no leite materno pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados (14; 15). Além disso, o leite materno pode abrigar cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (16). Segundo Blackwell et al. (17), *S. aureus* é o microrganismo mais comumente isolado de crianças saudáveis entre 2-4 meses de vida. Destes, mais de 60% produziu uma ou mais tipos de toxinas.

A maior preocupação quanto à presença de *S. aureus*, no entanto, incide sobre a ocorrência de cepas que produzem toxinas, que são resistentes à pasteurização (14; 15). Assim, as intoxicações ocorrem quando o alimento ingerido possui toxinas que foram produzidas pelo microrganismo durante o preparo. Deste modo, o aparecimento de um quadro de enfermidade não está relacionado com a ingestão de células viáveis, mas sim com a ingestão de alguma toxina (18; 19; 20).

As enterotoxinas estafilocócicas (EST's) estão entre as diversas proteínas extracelulares de baixo peso molecular sintetizadas pelo *S. aureus*. A intoxicação alimentar causada pelas EST's é provocada pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado e não mantido sob controle térmico apropriado (21; 22). Estas toxinas são termorresistentes e assim, durante o processo de cozimento a bactéria perece, mas as toxinas permanecem ativas (10; 19; 20).

Segundo Novak (23), estas enterotoxinas são proteínas hidrossolúveis e que apresentam características de estrutura, composição aminoacídica e atividades farmacológicas semelhantes. No entanto, possuem propriedades imunológicas distintas e resistência a enzimas proteolíticas. Assim, estas são divididas em cinco grupos imunológicos distintos: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (21; 22; 23). No entanto, Jørgensen et al. (24) citam que atualmente são conhecidos 18 grupos (SEA, SEB, SEC [subgrupo SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>], SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU), porém somente as oito primeiras foram associadas a surtos de intoxicação alimentar.

Diversos fatores influem na produção das EST's, como por exemplo, presença de microbiota competidora, atividade de água, temperatura, pH, concentração de cloreto de sódio e tensão de O<sub>2</sub>. Cada uma destas características apresenta valores específicos para cada EST (23).

Os sintomas da intoxicação variam conforme a sensibilidade do indivíduo. Porém, normalmente ocorrem náuseas, vômitos e cólicas abdominais. Quadros mais graves incluem fezes mucossangüinolentas, desidratação e choque (23).

As EST's unem-se, nos linfócitos T, ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II, agindo como superantígenos, pois estimulam este complexo, além da mitose de linfócitos (23; 25). Além disso, caso a resposta corporal às citosinas induzidas por estes superantígenos não for controlada, há possibilidade de ocorrência de danos aos tecidos ou mesmo morte (17).

Determinados fatores, como maior incidência de receptores para *S. aureus* em certas faixas etárias (como o antígeno de Lewis), infecções virais e o fumo (no caso de crianças, passivo), podem aumentar a ligação de *S. aureus* às células e, por seqüente, produção de toxinas (17; 26).

Por serem termoestáveis, estas toxinas podem veicular-se mesmo por alimentos cozidos (21; 22; 27). Segundo Novak et al. (28), leite processado de forma inadequada pode permitir um



aumento nas contagens de *S. aureus*, possibilitando a produção de EST's, que podem suportar temperaturas de 100°C por até 30 minutos. Assim, o leite pasteurizado pode estar livre de microrganismos, mas conter EST's.

Em 1999, Novak (23) pesquisou a presença de *S. aureus* resistentes à metilina em leite materno e detectou que certas cepas, além de apresentarem resistência ao referido antimicrobiano, cresciam eficientemente no colostro humano, sendo também verificado que estas liberavam enterotoxinas no leite.

Atualmente, as altas taxas de infecções adquiridas em hospitais por crianças recém-nascidas, principalmente as prematuras, são de grande preocupação dos profissionais de saúde. Diversos fatores críticos têm-se mostrado associados a este problema, sendo o alimento consumido por estas crianças, principalmente as fórmulas infantis e leite materno contaminados, o veículo principal de propagação de patógenos e metabólitos microbianos nestes quadros (29).

No caso do leite materno, a contaminação normalmente ocorre devido a infecções maternas e/ou colonização por bactérias oportunistas ou ainda por ordenha, manipulação ou armazenamento errôneos (29).

Blackwell et al. (26), citam que a Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI) é assim diagnóstica quando ocorre morte inesperada da criança, não havendo histórico de doença que a justifique, além dos exames *post mortem* não identificarem uma causa da morte adequada. No entanto, Blackwell et al. (17), citam que há evidências que bactérias toxigênicas possam desencadear os eventos que levem a esta síndrome.

Apesar de todos os esforços, SMSI é ainda a principal causa de morte entre crianças de 1 semana e 1 ano de vida nos países industrializados. Em 86% das crianças que foram vitimadas pela SMSI, a presença de *S. aureus* foi detectada, enquanto que, em crianças saudáveis, esta percentagem é de 56% (26).

Blackwell et al. (26) e Zorgani et al. (30) relatam que em mais da metade dos casos de SMSI, toxinas estafilocócicas foram encontradas em amostras de tecidos das crianças mortas. Além disso, Blackwell et al. (26), citam que as cepas isoladas de casos de SMSI produzem toxinas que variaram conforme as áreas pesquisadas. Assim, na Escócia predominaram SEB e SEC, já na Hungria, o domínio foi de SEA.

No entanto, a substituição do aleitamento materno, pelas fórmulas infantis e/ou leites de outras espécies que não a humana não é aconselhável. Esta substituição pode comprometer a saúde da criança, quer nos países desenvolvidos, com a ocorrência de doenças alérgicas e metabólicas, quer nos países em desenvolvimento, com o aumento da morbidade e mortalidade entre os menores de um ano (31). Além disso, Blackwell et al. (17), citam que o leite materno reduz significativamente a ligação de patógenos às células epiteliais, além de conter IgA e outros anticorpos específicos que afetam a ligação das células bacterianas às epiteliais.

## Referências

1. **Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home> Acesso em: 1º de agosto de 2007.
2. Rechtman DJ, Lee ML, Berg H. Effect of Environmental Conditions on Unpasteurized Donor Human Milk. *Breastfeeding Medicine* 2006; 1: 24-26.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano.** 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 48p.
4. Galhardo ALSM, Araújo WMC, Borgo LA. Acidez *Dornic* como parâmetro de qualidade, em bancos de leite humano. *Higiene Alimentar* 2002; 16: 16-27.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de promoção do aleitamento materno: normas técnicas.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 52p.
6. Martins Filho J. Como e porque amamentar? São Paulo: Sarvier, 1987.
7. Tully DB, Jones F, Tully MR. Donor Milk: what's in it and what's not. *J Hum Lact* 2001, 17: 152-155.
8. Novak FR, Almeida JAG, Asensi MD, Moraes BA, Rodrigues DP. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. *Caderno de Saúde Publica* 2001, 17: 713-717.
9. Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite [dissertação mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1986.
10. Jay JM. *Microbiologia moderna de los alimentos.* Zaragoza: Acribia, 1994.
11. Rozolen CDAC, Goulart AL, Kopelman BI. Is breast milk collected at home suitable for raw consumption by neonates in Brazilian public neonatal intensive care units? *J Hum Lact* 2006; 22: 418-425.

12. Warner BB, Sapsford A. Misappropriated human milk: fantasy, fear, and fact regarding infectious risk. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 2004; 4: 56–61.
13. Fetherston C. Relationships between clinical descriptors and changes in the physiology of the lactating breast before, during and after non-inflammatory and inflammatory breast disorders [tese doutorado]. Perth: School of Biomedical and Chemical Sciences, Faculty of Life and Physical Sciences, University of Western Australia, 2003.
14. Serafini AB, André MCDPB, Rodrigues MAV, Kipnis A, Carvalho CO, Campos MRH, Monteiro EC, Martins F, Jubé TFN. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. *Rev. Saúde Pública* 2003; 37: 775-779.
15. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural* 2004; 34: 1315–1320.
16. Sousa MA, Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2004; 40: 101-111.
17. Blackwell CC, Moscovis SM, Gordon AE, Madani OMA, Hall ST, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-Thomson J, Weir DM, Busuttill A. Ethnicity, infection and sudden infant death syndrome. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2004; 42: 53–65.
18. Gava AJ. Princípios de tecnologia de alimentos. São Paulo: Nobel, 1985.
19. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.
20. Pelczar MJ. Microbiologia: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron Books, 1997.
21. Trabulsi LR. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.
22. Forsythe SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2002.
23. Novak FR. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado [tese doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

24. Jørgensen HJ, Mathisen T, Løvseth A, Omoe K, Qvale KS, Loncarevic S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 252: 267–272.
25. Langley R, Wines B, Willoughby N, Basu I, Proft T, Fraser JD. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc $\alpha$ RI binding and serum killing of bacteria. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 2926-2933.
26. Blackwell CC, Gordon AE, James VS, Mackenzie DAC, Mogensen-Buchannan, M, El Ahmer OR, Madani OM, Törö K, Cuskas Z, Sótonyi P, Weir DM, Busuttil A. The role of bacterial toxins in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *Int. J. Med. Microbiol* 2002; 291: 561–570.
27. Evangelista J. Alimentos – um estudo abrangente. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1992.
28. Novak FR, Almeida JAG, Warnken MB, Ferreira-Carvalho BT, Hagler AN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Human Milk. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 29-33.
29. Carneiro LAM, Queiroz MLP, Merquior VLC. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast milk. *Journal of Medical Microbiology* 2004; 53: 761–768.
30. Zorgani AA, Al Madani O, Essery SD, Bentley AJ, James VS, Mackenzie DAC, Keeling JW, Rambaud C, Hilton J, Blackwell CC, Weir DM, Busuttil A. Detection of pyrogenic toxins of *Staphylococcus aureus* in cases of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 1999; 25: 103–108.
31. Nejar FF, Segall-Corrêa AM, Rea MF, Vianna RPT, Panigassi G. Padrões de aleitamento materno e adequação energética. *Cad. Saúde Pública* 2004; 20.

## **CAPÍTULO 3**

**Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em leite materno proveniente de Banco de Leite Humano em Blumenau, Brasil**

## **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas em leite materno proveniente de Banco de Leite Humano em Blumenau, Brasil**

### **RESUMO**

O leite materno é o alimento ideal ao bebê humano. Porém, devido a diversos fatores, não são todas as mães que podem amamentar, sendo necessários, assim, os Bancos de Leite Humano, que são centros de coleta, tratamento e distribuição de leite materno. Este trabalho objetivou a verificação da presença de *Staphylococcus aureus*, bem como suas toxinas, em leite materno cru, pasteurizado e descongelado no lactário. A presença de estafilococos coagulase positiva mostrou-se significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) entre as amostras, com contagens variando de  $7,0 \times 10^1$  a  $> 6,50 \times 10^6$  UFC/mL;  $1,0 \times 10^1$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^1$  a  $6,0 \times 10^2$  UFC/mL no leite cru, leite pasteurizado e leite coletado no lactário, respectivamente. Das cepas isoladas para identificação, *S. aureus* foi encontrado em 29,1% no leite cru; 27,3% no pasteurizado e em 60% no coletado no lactário. Não foi detectada a presença de enterotoxinas estafilocócicas em nenhuma das amostras das diferentes etapas. Porém, a contaminação do leite pasteurizado e do lactário por *S. aureus*, já é preocupante por si só, sendo necessárias mais pesquisas para determinar a real ocorrência destas toxinas.

**Palavras-chave:** leite materno, *Staphylococcus aureus*, enterotoxina

## INTRODUÇÃO

O leite humano, por ser espécie-específico, é o alimento ideal ao bebê humano (Brasil, 1997; Brasil, 1998; Heikkilä e Saris, 2003; Bortolozzo et al., 2004; Gartner et al., 2005; Rechtman et al., 2006). Todas as formulações substitutas diferem dele, tornando-o superior para a alimentação dos recém-nascidos (Sarkar, 2004; Gartner et al., 2005). Nos países em desenvolvimento o aleitamento materno é de grande importância para a sobrevivência de crianças nos primeiros anos de vida. Estima-se que todo ano cerca de 1 milhão de crianças morram de diarreia, infecções respiratórias agudas e outras doenças infecciosas, porque não foram adequadamente amamentadas ao peito (Brasil, 1997).

Apesar dos benefícios relacionados ao aleitamento, muitas mães não podem, ou não querem, amamentar seus filhos (Rechtman et al., 2006). Para atender a demanda de lactentes impossibilitados de serem amamentados pela própria mãe, há a necessidade de leite humano ordenhado e, assim, de Bancos de Leite Humano (BLH's) (Brasil, 1998). O Brasil possui a maior rede de BLH's do mundo, contando em 11 de abril de 2007 com 181 bancos de leite e 12 postos de coleta cadastrados (Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, 2007). Para garantir a qualidade do leite fornecido às crianças, as doadoras devem ser sadias e ter uma quantidade de secreção láctea superior à necessidade de seu filho, além de doar o excedente por livre e espontânea vontade (Brasil, 1998; Galhardo et al., 2002).

Da mesma forma que o leite materno constitui um alimento ideal para lactentes, uma vez que a sua composição apresenta todos os nutrientes necessários, este pode constituir um excelente meio de cultura para os microrganismos, assim que esgotarem os fatores de defesa antimicrobiana intrínsecos (Almeida, 1986; Jay, 1994, Rede Nacional de Bancos de Leite Humano, 2005; Rozolen et al., 2006).

Reviriego et al. (2005) citam que normalmente um pequeno espectro de bactérias Gram positivas é isolado do leite materno. Estas incluem estafilococos, estreptococos, micrococos, lactobacilos e enterococos. Segundo Fetherston (2003), *Staphylococcus aureus* é o organismo predominante nos quadros de mastite. Sua presença, porém, no leite materno pode ser interpretada como contaminação secundária a partir da pele e fossas nasais, ou por condições higiênicas ou sanitárias insatisfatórias dos utensílios empregados (Serafini et al., 2003; Fagundes e Oliveira, 2004). Além disso, o leite materno pode abrigar cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (Sousa e Lencastre, 2004).

*S. aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas (localizadas tanto na pele como em regiões mais profundas) além de causar vários tipos de intoxicações, a partir de um



processo infeccioso, síndrome da pele escaldada, impetigo bolhoso, ou não, como intoxicação alimentar ou síndrome do choque tóxico (Evangelista, 1992; Trabulsi, 1999; Tortora et al., 2000; Sousa e Lencastre, 2004).

As intoxicações ocorrem quando o alimento ingerido possui toxinas que foram produzidas por microrganismos durante sua preparação. Deste modo, o aparecimento de um quadro de enfermidade não está relacionado com a ingestão de células viáveis, mas sim com a ingestão de alguma toxina (Gava, 1985; Franco e Landgraf, 2003; Pelczar, 1997). Um exemplo seria a ingestão da toxina produzida pelo *S. aureus*.

As enterotoxinas estafilocócicas (EST's) estão entre as diversas proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons) sintetizadas pelos *S. aureus*. A intoxicação alimentar causada pelas EST's é provocada pela ingestão de toxinas previamente formadas no alimento contaminado e não mantido sob controle térmico apropriado (Trabulsi, 1999; Forsythe, 2002).

Segundo Novak (1999), são proteínas hidrossolúveis e que apresentam características de estrutura, composição de aminoácidos e atividades farmacológicas semelhantes. No entanto, possuem resistência a enzimas proteolíticas e propriedades imunológicas distintas. Assim, estas são divididas em cinco grupos imunológicos distintos segundo Novak (1999), Trabulsi (1999) e Forsythe (2002): A, B, C, D e E. No entanto, Jørgensen et al. (2005) citam que atualmente são conhecidos 18 grupos (SEA, SEB, SEC [subgrupo SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>], SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU), porém somente as primeiras 8 foram associadas a surtos de intoxicação alimentar.

Diversos fatores influem na produção das EST's, como por exemplo, presença de microbiota competidora, atividade de água, temperatura, pH, concentração de cloreto de sódio e tensão de O<sub>2</sub>. Cada uma destas características apresenta valores específicos para cada EST (Novak, 1999).

Estas toxinas são termoestáveis, podendo veicular-se mesmo por alimentos cozidos (Evangelista, 1992; Trabulsi, 1999; Forsythe, 2002). Segundo Novak et al. (2000), leite processado de forma inadequada pode permitir um aumento nas contagens de *S. aureus*, possibilitando a produção de EST's, que podem suportar temperaturas de 100°C por até 30 minutos. Assim, o leite pasteurizado pode estar livre de microrganismos, mas conter EST's.

Zorgani et al. (1999) e Blackwell et al. (2002) relatam que em mais da metade dos casos da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS) toxinas estafilocócicas foram encontradas em

amostras de tecidos das crianças mortas. Nestes casos, as fórmulas infantis e o leite materno contaminados são considerados os principais veículos de propagação destes metabólitos (Carneiro et al., 2004). Além disso, Blackwell et al. (2002) citam que as cepas isoladas de casos de SIDS produzem toxinas que variaram conforme as áreas pesquisadas. Assim, na Escócia predominaram SeB e SEC, já na Hungria, o predomínio foi de SEA.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de pesquisar a presença de *S. aureus*, bem como de suas toxinas, em leite materno cru, pasteurizado e descongelado no lactário do Hospital Santo Antônio em Blumenau, Santa Catarina.

## MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do *Campus III* da Universidade de Blumenau (FURB).

Foram avaliadas todas as 40 mães que doaram leite durante o período de execução das análises (agosto a novembro de 2006). De cada doadora foram analisadas amostras de leite não pasteurizado (leite cru), leite após a pasteurização e do leite descongelado oferecido às crianças internadas no Hospital Santo Antônio de Blumenau, Santa Catarina.

As amostras do leite cru e pasteurizado foram coletadas no Banco de Leite Humano de Blumenau e as do leite oferecido aos bebês foram obtidas no momento do descongelamento do leite no lactário do Hospital Santo Antônio, também em Blumenau. Estas foram encaminhadas imediatamente ao laboratório. As amostras foram acondicionadas em embalagens estéreis próprias dentro de caixas isotérmicas contendo gelo ecológico. Ao chegarem ao laboratório, estas foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise, em no máximo 30 minutos.

Não houve contato direto ou indireto (avaliação de dados cadastrais) entre os pesquisadores e as doadoras. Isto ocorreu de modo a evitar conclusões tendenciosas baseadas em indicadores sócio-econômicos, idade, escolaridade, etc. Assim, todas as doadoras permaneceram anônimas no tocante à pesquisa.

## ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A análise microbiológica utilizou o meio de cultura Baird-Parker RPF (BP RPF; REF 44 003, bioMérieux), ocorrendo de acordo com as instruções providas pelo manual, normas NF EN ISO 6888-2 (1999) e NF V 08-057-2 (2004). Este meio de cultura possui a mesma formulação do

meio Baird Parker original, sendo suplementado com fibrinogênio de plasma de coelho (RPF), que permite a detecção da atividade de coagulase.

Desta forma, foram realizadas diluições decimais do leite, até  $10^{-3}$  para o leite cru e  $10^{-1}$  para o leite pasteurizado e do lactário. Foram transferidos, em duplicata, 1,0 ml de cada uma destas diluições para placas de Petri, que então receberam o BP RPF ainda fundido (método *Pour-plate*), sendo incubadas invertidas a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 24-48 horas. As unidades formadoras de colônia (UFC's) com características típicas para *Staphylococcus aureus* foram submetidas à testes posteriores de coloração de Gram e catalase.

Posteriormente, as cepas que obtiveram os melhores resultados para os testes acima citados foram inoculadas em galerias ID 32 STAPH (REF 32 500, bioMérieux) segundo as orientações do fabricante. Após o período de incubação ( $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas em condições aeróbias), as galerias foram lidas com o auxílio do sistema mini API (bioMérieux).

#### ANÁLISES DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Todas as amostras de leite foram pesquisadas para a presença de enterotoxinas estafilocócicas (EST). Para tanto, foi utilizado o kit VIDAS Staph enterotoxin II (SET2; REF 30 705, bioMérieux), capaz de identificar e discriminar sete destas enterotoxinas, a saber: SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED e SEE. A preparação das amostras seguiu as orientações do fabricante para produtos lácteos líquidos, sendo utilizada a concentração com ácido tricloroacético (TCA), a qual aumenta a sensibilidade do método de extração. Os resultados foram lidos pelo aparelho mini VIDAS (bioMérieux).

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Devido ao fato de não serem aceitas contagens de patógenos no leite após a pasteurização, foi realizado o teste de qui-quadrado, que verifica presença ou ausência, para avaliar as contagens nas três diferentes etapas. Para tanto, utilizou-se nível de significância de 99% ( $p < 0,01$ ) e o programa Statistica<sup>®</sup> (versão 6.0). Os dados referentes ao miniAPI e ao miniVIDAS não foram sujeitos à análise estatística uma vez que estes são qualitativos e não quantitativos.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

A Tabela 01 apresenta os resultados para as contagens de estafilococos coagulase positiva em meio BP-RPF.

Conforme esperado para o leite cru, 100% das amostras apresentaram contagens para estafilococos coagulase positiva, dados estes que diferem dos encontrados por Israel-Ballard et al. (2006), onde apenas 6 das 38 amostras analisadas (15,8%) apresentaram-se positivas para *S. aureus*.

O número de UFC/mL apresentou grande variação entre as amostras, oscilando entre  $7,0 \times 10^1$  a  $>6,5 \times 10^6$  UFC/mL. Esta variação é maior do que a encontrada por Pereira et al. (1995), que, ao analisarem leite proveniente de 19 mulheres, das quais 9 eram consideradas sadias e 10 apresentavam sintomas clínicos de mastite, verificaram contagens na ordem de  $10^1$  a  $10^4$  UFC/mL. Osterman e Rahm (2000) ao também analisarem o leite de mulheres com sintomas de mastite, encontraram contagens de *S. aureus* que variavam entre  $10^3$  a  $>10^5$ .

A qualidade microbiológica do leite materno, até 2006, era determinada pela Resolução – RDC n.º. 12, de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001). Esta preconizava, entre outros, a ausência de estafilococos coagulase positivos em 1 mL no leite pasteurizado. No entanto, com a aprovação da Resolução – RDC n.º. 171, de 04 de setembro de 2006 (ANVISA, 2006), os subitens referentes às análises microbiológicas de estafilococos coagulase positiva, de *Salmonella* spp. e de aeróbios mesófilos viáveis foram revogados. Assim, o único grupo de microrganismos citado na RDC 171 é o grupo coliformes, não existindo padrões de referência para os estafilococos coagulase positivos. Porém, segundo a norma técnica BLH-IFF/NT- 34.05, da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano de 2005, o processo de pasteurização deve inativar 100% dos microrganismos patogênicos. Desta forma, qualquer contagem de *Staphylococcus* spp. no leite pasteurizado o tornaria impróprio ao consumo.

Assim, a pasteurização mostrou-se efetiva em 27 (67,5%) das 40 amostras de leite pasteurizado. Nas 12 demais, esta redução variou de 98,4 a 99,9%, não sendo, portanto, efetiva. Com relação à amostra de número 20, não foi possível determinar a porcentagem de inativação de microrganismos, uma vez que as médias das contagens do leite cru foram  $>6,50 \times 10^6$  UFC/mL. Porém, a presença de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL no leite pasteurizado já é suficiente para descartá-lo.

Ao utilizar o método *flash-heat*, processo similar à pasteurização, no qual o frasco contendo o leite é mantido dentro de um recipiente com água até que esta entre em ebulição, Israel-Ballard et al. (2006) não encontraram contaminação proveniente de *S. aureus* no leite processado.

Ainda de acordo com a Tabela 01, observa-se que em 11 das 13 amostras com contagens no leite pasteurizado, não houve crescimento bacteriano nas amostras coletadas no lactário, incluindo a amostra de número 20. Isto pode ser decorrente do efeito do congelamento pós-pasteurização, aliado à células bacterianas estressadas e ao sistema imune inato do leite. No entanto, quatro amostras apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva, que variaram de  $1,0 \times 10^1$  a  $6,0 \times 10^2$  UFC/mL. Salles e Goulart (1997) reportam a presença de uma amostra proveniente de lactário, dentre as 24 analisadas, contaminada com *S. aureus* ( $1,0 \times 10^3$  UFC/mL)

Das amostras contaminadas, houve contagens no leite pasteurizado nas de número 02 e 23, sendo que os valores encontrados no leite pasteurizado foram menores que os encontrados no leite coletado no lactário. Este aumento no número de UFC/mL pode ter duas origens. Uma seria o crescimento bacteriano ocorrido entre a pasteurização e o congelamento do leite no BLH ou durante o descongelamento no lactário do hospital. A outra origem seria de contaminação pós-pasteurização mediada por portadores de *Staphylococcus* spp., que pode ter ocorrido tanto no BLH quanto no lactário. No caso das amostras 03 e 32, que não apresentaram contagens no leite pasteurizado, a única explicação possível seria de contaminação pós-pasteurização por meio de portadores. Salles e Goulart (1997) ao analisarem as mãos de manipuladores em dois lactários de Florianópolis, encontraram portadores de *S. aureus* em 1 dos 11 funcionários do lactário A e em 1 dos 5 funcionários do lactário B. Petzold (2005) também encontrou portadores de *Staphylococcus* spp. ao analisar os funcionários de um lactário.

Por meio do teste de qui-quadrado ( $p < 0,01$ ), observou-se que há diferenças estatísticas entre as amostras de leite dos diferentes tipos. Desta forma, os leites cru, pasteurizado e coletado no lactário foram diferentes quanto a presença de estafilococos coagulase positiva.

#### DETERMINAÇÃO POR MINI API

De todas as amostras que apresentaram crescimento em BP RPF, isolou-se pelo menos uma UFC para identificação com auxílio do sistema mini API, sendo analisadas 71 UFC's (Tabela 02).

Através da Tabela 02 pode-se observar que os organismos do gênero *Staphylococcus* representaram a maioria das cepas identificadas. No total, 83,6% das cepas isoladas a partir do leite cru, 90,9% das isoladas do leite pasteurizado e 100% das isoladas do leite coletado no lactário pertencem a este gênero. Heikkilä e Saris (2003), em um estudo sobre os efeitos inibitórios da biota comensal do leite sobre *S. aureus*, detectaram que de 40 amostras de leite

analisadas, 39 apresentavam-se contaminadas com bactérias do gênero *Staphylococcus*, fato similar ao encontrado neste trabalho. Estes mesmos autores ainda relatam que, das 509 cepas isoladas a partir do meio de cultura MRS para identificação, 327 (64%) foram identificadas como espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Kawada et al. (2003) também reportam a presença de *S. aureus* no leite cru coletado, porém em apenas 3 das 8 (37,5%) mães analisadas. Com relação a outras espécies de *Staphylococcus*, estas foram isoladas em sete das oito mães. Fetherston (2003) também encontrou baixa ocorrência de *S. aureus* no leite de mulheres com sintomas de mastite. Apenas 2 das 13 mães apresentavam este microrganismo. No entanto, a presença de espécies de estafilococos coagulase negativos deu-se em 12 das 13 mães analisadas.

No leite cru, a espécie *S. aureus* foi identificada em 29,1% dos casos e, ao compararem-se estes dados com os obtidos por Serafini et al. (2003), observa-se uma maior ocorrência de *S. aureus* do que os relatados por estes autores (7,3%). A mesma situação ocorre ao serem analisados os dados obtidos por Rozolen et al. (2006), que ao avaliarem 90 amostras de leite cru, encontraram apenas 5 (5,6%) contaminadas com *S. aureus*. Heikkilä e Saris (2003) também reportam valores baixos de *S. aureus* isolados a partir do leite cru, apenas 1,8%.

Com relação à presença de *S. epidermidis*, os dados de Serafini et al. (2003) identificaram este microrganismo em 20,6% das amostras isoladas e Heikkilä e Saris (2003) os identificaram em 50% das cepas.

Outras espécies do gênero *Staphylococcus*, como *S. capitis*, *S. caprae* e *S. chromogenes*, também foram encontradas no leite cru. Heikkilä e Saris (2003) identificaram *S. capitis* em 2,9% das cepas.

Houve ainda a presença *Kocuria rosea*, *Micrococcus* spp. e *M. lylae* (10,9% das cepas isoladas). Kawada et al. (2003) citam a presença de espécies de *Micrococcus* em 3 das 8 mães investigadas. Petzold (2005) cita a presença de manipuladores de leite em BLH portadores de espécies de *Micrococcus*.

No tocante ao leite pasteurizado, 27,3% das cepas foram identificadas como *S. aureus* e 9,1% como *S. intermedius*. Esta espécie não havia sido identificada no leite cru e também não foi encontrada no coletado no lactário e os perfis fornecidos pelo MiniAPI mostraram-se duvidosos. Isto indica possível uso de cepa estressada ou de suspensão não homogênea. Ainda foi identificada no leite pasteurizado uma terceira espécie, a *K. rosea*

Similarmente ao que aconteceu com o leite cru, os dados de Serafini et al. (2003) mostram níveis de *S. aureus* inferiores (2,7%) no leite pasteurizado aos encontrados no presente

trabalho. Ainda segundo Serafini et al. (2003), foram encontrados *S. epidermidis*, em 20,6% das amostras, e *S. lugdenensis*, em 2,7%.

Já as cepas isoladas a partir do leite proveniente do lactário do Hospital Santo Antônio, 100% pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, sendo que 60% delas eram da espécie *S. aureus*.

#### DETERMINAÇÃO DE TOXINAS

Todas as 120 amostras foram pesquisadas quanto a presença de EST's. Apesar das altas contagens de UFC's encontradas no leite cru, nenhuma amostra de nenhuma das etapas avaliadas apresentou-se contaminada com estas toxinas.

Novak et al. (2000) estudaram 500 amostras de leite provenientes de 5 BHL's brasileiros. Destas amostras, isolaram 40 cepas de *S. aureus* resistentes a metilina, das quais duas eram produtoras de enterotoxina estafilocócica B. Estes autores detectaram a presença de enterotoxinas estafilocócicas em colostro humano, no entanto, este foi intencionalmente inoculado com as cepas isoladas que produziam toxinas, de modo a determinar-se a viabilidade do crescimento e produção de toxinas no colostro. Assim, determinaram que em 5 horas de cultivo a 37°C as contagens já atingiam  $1,9 \times 10^5$  UFC/mL, ocorrendo inclusive liberação de enterotoxina no meio.

Novak et al. (2000) também salientam que a detecção de toxinas foi dependente do uso de culturas frescas (não estressadas), de metodologia com grande sensibilidade (0,5ng/mL) e da ausência de competidores no colostro utilizado. Estes ainda afirmam que as cepas de *S. aureus* produtoras de toxinas são extremamente variáveis no tocante à frequência de isolamento e tipo de toxina produzida.

Vernozy-Rozand et al. (2004) avaliaram o método de precipitação baseado no TCA frente ao método tradicional de concentração por diálise para diversos produtos lácteos. A detecção das enterotoxinas foi realizada por dois métodos: VIDAS SET2 e Transia Plate. Os dados referentes ao leite pasteurizado adicionado de concentrações conhecidas de SEA, SEB, SEC<sub>2</sub>, SED e SEE mostraram que o método do TCA utilizando o foi mais sensível e reprodutível do que o de concentração por diálise. Este método, em conjunto com o VIDAS SET2, além de ter detectado mesmo as menores concentrações de enterotoxinas adicionadas ao leite, não apresentou resultados falso-positivos, falso negativos ou mesmo discrepantes.

Hennekinne et al. (2006), ao avaliarem produtos lácteos utilizando outra metodologia de extração, também citam a especificidade do Vidas SET2. Além disso, apontam o fato deste kit não produzir resultados falso-positivos.

Ao analisarem o leite de 73 mulheres, Harrison et al. (2004) detectaram que todas as amostras foram positivas para IgA contra SEC. Também foi detectada uma correlação entre os níveis de IgA no leite e na saliva dos bebês. Assim, uma diminuição da IgA no leite materno acarretava um aumento nestes níveis na saliva, com uma espécie de compensação.

Os anticorpos presentes no leite materno podem neutralizar a atividade de toxinas bacterianas produzidas por patógenos gastrintestinais, inibindo a ligação aos receptores intestinais (Harrison et al., 2004).

Sabe-se que, apesar das EST's serem produzidas principalmente por *S. aureus*, outras espécies coagulase negativas do gênero, como o *S. intermedius* e *S. hyicus*, também podem produzi-las, não podendo sua presença ser desconsiderada ou desvalorizada (Adesiyun et al., 1984; Hirooka et al., 1988; Jørgensen et al., 2005, Loncarevic et al., 2005). No caso da espécie *S. intermedius*, em 1971, esta já havia sido reconhecida como agente causadora de um surto (Breckinridge e Bergdoll, 1971).

## CONCLUSÃO

As análises microbiológicas mostraram níveis altos de *S. aureus* no leite cru. Apesar do leite pasteurizado também ter apresentado contagens para o referido microrganismo, a pasteurização foi efetiva em 67,5% das amostras. Já o leite coletado no lactário apresentou contaminação em apenas 4 amostras. Estatisticamente, todas as amostras diferiram entre si.

Com relação aos microrganismos identificados pelo sistema mini Api, 83,6% das cepas isoladas a partir do leite cru, 90,9% das isoladas do leite pasteurizado e 100% das isoladas do leite coletado no lactário pertenciam ao gênero *Staphylococcus*. A espécie *S. aureus* estava presente em 29,1%; 27,3% e 60% das cepas isoladas dos leite cru, pasteurizado e do lactário, respectivamente.

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas (EST's) mostrou que, apesar da alta contaminação inicial por *S. aureus*, nenhuma das amostras apresentava-se contaminada.

## REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de promoção do aleitamento materno: normas técnicas**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 52p.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 48p.



3. HEIKKILÄ, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 471–478, 2003.
4. BORTOLOZO, E.A.F.Q.; TIBONI, E.B.; CÂNDIDO, L.M.B. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. **Rev Panam Salud Publica**, v.16, n.3, p. 1-12, 2004.
5. GARTNER, L.M.; MORTON, J.; LAWRENCE, R.A.; NAYLOR, A.J.; O'HARE, D.; SCHANLER, R.J. Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics**, v. 115, n. 2, p. 496-501, 2005.
6. RECHTMAN, D.J.; LEE, M.L.; BERG, H. Effect of Environmental Conditions on Unpasteurized Donor Human Milk. **Breastfeeding Medicine**, v. 1, n. 1, p. 24-26, 2006.
7. SARKAR, S. Therapeutic aspects of breast milk. **Nutrition & Food Science**, v. 34, n. 3, p. 108-112, 2004.
8. **Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano**. Disponível em:  
<<http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>> Acesso em: 13 de abril de 2007.
9. GALHARDO, A. L. S. M.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Acidez *Dornic* como parâmetro de qualidade, em bancos de leite humano. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 16-27, 2002.
10. ALMEIDA, J. A. G. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite**. 1986. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.
11. JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.
12. ROZOLEN, C.D.A.C.; GOULART, A.L.; KOPELMAN, B.I. Is Breast Milk Collected at Home Suitable for Raw Consumption by Neonates in Brazilian Public Neonatal Intensive Care Units? **J Hum Lact**, v. 22, n. 4, p. 418-425, 2006.
13. REVIRIEGO, C.; EATON, T.; MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; GASSON, M.J.; RODRÍGUEZ, J.M. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk. **J Hum Lact**, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2005.
14. FETHERSTON, C. Relationships between clinical descriptors and changes in the physiology of the lactating breast before, during and after non-inflammatory and inflammatory breast disorders. Tese (Doutorado em Filosofia) – School of Biomedical and Chemical Sciences, Faculty of Life and Physical Sciences, University of Western Australia, Perth, 2003.
15. SERAFINI, Á.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RODRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, É.C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T.F.N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Rev Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 775-779, 2003.

16. FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315–1320, jul-ago, 2004.
17. SOUSA, M.A.; LENCASTRE, H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 101-111, 2004.
18. EVANGELISTA, J. **Alimentos – um estudo abrangente**. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1992. 450p.
19. TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.
20. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, Christine L; *et al.*, **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
21. GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7.ed. São Paulo: Nobel, 1985. 284p.
22. FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.
23. PELCZAR, M. J. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 2v.
24. FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
25. NOVAK, F.R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 102 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.
26. JØRGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 267–272, 2005.
27. NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; WARNKEN, M.B.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; HAGLER, A.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Human Milk. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 29-33, 2000.
28. ZORGANI, A.A.; AL MADANI, O.; ESSERY, S.D.; BENTLEY, A.J.; JAMES, V.S.; MACKENZIE, D.A.C.; KEELING, J.W.; RAMBAUD, C.; HILTON, J.; BLACKWELL, C.C.; WEIR, D.M.; BUSUTTIL, A. Detection of pyrogenic toxins of *Staphylococcus aureus* in cases of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v.25, p.103–108, 1999.
29. BLACKWELL, C.C.; GORDON, A.E.; JAMES, V.S.; MACKENZIE, D.A.C.; MOGENSEN-BUCHANAN, M.; EL AHMER, O.R.; MADANI, O.M.; TÖRÖ, K.;

- CUSKAS, Z.; SÓTONYI, P.; WEIR, D.M.; BUSUTTIL, A. The role of bacterial toxins in Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). **Int. J. Med. Microbiol**, v.291, p.561–570, 2002.
30. CARNEIRO, L.A.M., QUEIROZ, M.L.P., MERQUIOR, V.L.C. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast milk. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.761–768, 2004.
31. Norme NF EN ISO 6888-2: Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 35/37°C. Partie 2 – Technique sans confirmation utilisant le milieu gélososé au pasma de lapin et fibrinogène. 1999.
32. Norme NF V 08-057-2: Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – Partie 2 – Technique sans confirmation des colonies. 2004.
33. ISRAEL-BALLARD K, COUTSODIS A, CHANTRY CJ, STURM AW, KARIM F, SIBEKO L, ABRAMS B. Bacterial Safety of Flash-heated and Unheated Expressed Breastmilk during Storage. *Journal of Tropical Pediatrics* 2006;52:399-405.
34. PEREIRA ML, CARMO LS, SANTOS EJ, SELLOS IT, BERGDOLL MS. Staphylococci in breast milk from women with and with and without mastitis. *Rev. Microbiol*, 1995;26:117-20.
35. OSTERMAN KL, RAHM V-A. Lactation Mastitis: Bacterial Cultivation of Breast Milk, Symptoms, Treatment, and Outcome. *J Hum Lact*, 2000;16:297-302.
36. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.
37. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Resolução – RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006.
38. REDE NACIONAL DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT- 34.05: Pasteurização do Leite Humano Ordenhado. Rio de Janeiro, 2005. 4p.
39. SALLES RK, GOULART R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev. Saúde Pública* 1997;31:1-10.
40. PETZOLD, S. **Portadores de bactérias patogênicas em manipuladores de leite materno em bancos de leite humano**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.
41. KAWADA M, OKUZUMI K, HITOMI S, SUGISHITA C. Transmission of Staphylococcus aureus Between Healthy, Lactating Mothers and Their Infants by Breastfeeding. *J Hum Lact*, 2003;19:411-417.

42. VERNOZY-ROZAND C, MAZUY-CRUCHAUDET C, BAVAI C, RICHARD Y. Improvement of a concentration protocol based on trichloroacetic acid for extracting staphylococcal enterotoxins in dairy products. *Revue Méd. Vét.* 2004;1155:533-537.
43. HENNEKINNE J-A, GUILLIER F, PERELLE S, DE BUYSER M-L, DRAGACCI S, KRYS S, LOMBARD B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology* 2006:1-12.
44. HARRISON LM, MORRIS JA, BISHOP LA, LAUDER RM, TAYLOR CAM, TELFORD DR. Detection of specific antibodies in cord blood, infant and maternal saliva and breast milk to staphylococcal toxins implicated in sudden infant death syndrome (SIDS). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2004;42:94–104.
45. ADESIYUM AA, TATINI SR, HOOVER DG. Production of enterotoxin (s) by *S. hyicus*. *Vet. Microbiol.* 1984;9:487-495.
46. HIROOKA EY, MULLER EE, FREITAS JC, VICENTE E,; YOSHIMOTO Y, BERGDOLL MS. Enterotoxigenicity of *S. intermedius* of canine origin. *Int. J. Food. Microbiol.* 1988;7:185-191.
47. LONCAREVIC S, JØRGENSEN HJ, LØVSETH A, MATHISEN T, RØRVIK LM. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology* 2005;98:344–350.
48. BRECKINRIDGE JC, BERGDOLL MS Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. *N. Engl. J. Med.* 1971;284:541-543.

## Tabelas

Tabela 01: Valores médios das contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* em meio BP-RPF, nas três etapas de processamento do leite materno.

N° amostra	Contagens (UFC/mL)			N° amostra	Contagens (UFC/mL)		
	Cru	Pasteurizado	Lactário		Cru	Pasteurizado	Lactário
01	$3,310^4$	$6,0 \times 10^1$	0	21	$1,00 \times 10^3$	0	0
02	$4,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^1$	$6,00 \times 10^2$	22	$2,2110^3$	0	0
03	$2,0 \times 10^5$	0	$1,50 \times 10^2$	23	$1,39 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
04	$2,2 \times 10^5$	0	0	24	$1,20 \times 10^6$	0	0
05	$2,8 \times 10^4$	0	0	25	$2,2310^6$	0	0
06	$2,4 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$	0	26	$6,70 \times 10^4$	0	0
07	$9,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^1$	0	27	$5,49 \times 10^4$	0	0
08	$4,1 \times 10^4$	$6,0 \times 10^1$	0	28	$3,32 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	0
09	$1,5 \times 10^5$	0	0	29	$1,0710^3$	0	0
10	$3,7 \times 10^5$	0	0	30	$3,0510^4$	0	0
11	$2,5 \times 10^3$	0	0	31	$2,68 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	0
12	$5,4 \times 10^3$	0	0	32	$3,73 \times 10^4$	0	$1,0 \times 10^1$
13	$1,1 \times 10^3$	0	0	33	$4,53 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1$	0
14	$8,6 \times 10^2$	0	0	34	$1,0510^3$	0	0
15	$1,8 \times 10^4$	0	0	35	$7,00 \times 10^1$	0	0
16	$1,8 \times 10^4$	0	0	36	$3,50 \times 10^4$	$9,0 \times 10^1$	0
17	$6,2 \times 10^5$	0	0	37	$3,30 \times 10^4$	0	0
18	$4,3 \times 10^4$	$6,5 \times 10^2$	0	38	$2,30 \times 10^2$	0	0
19	$7,3 \times 10^4$	$7,7 \times 10^2$	0	39	$6,01 \times 10^3$	0	0
20	$>6,50 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	0	40	$2,50 \times 10^2$	0	0

Tabela 02: Identificação das cepas isoladas do meio BP RPF de amostras de leite cru, pasteurizado e coletado no lactário.

Microrganismo	%		
	Cru	Pasteurizado	Lactário
<i>Kocuria rosea</i>	3,6	9,1	--
<i>Micrococcus lylae</i>	10,9	--	--
<i>Micrococcus spp.</i>	1,8	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,1	27,3	60,00
<i>Staphylococcus capitis</i>	3,6	--	--
<i>Staphylococcus caprae</i>	3,6	--	--
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3,6	--	--
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7,3	--	--
<i>Staphylococcus intermedius</i>	--	9,1	--
<i>Staphylococcus spp.</i>	36,4	54,5	40,00

Legenda: --: microrganismo não encontrado nesta etapa

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises microbiológicas mostraram níveis altos de contaminação de *S. aureus* no leite cru. Apesar do leite pasteurizado também ter apresentado contagens para o referido microrganismo, a pasteurização foi efetiva em 67,5% das amostras. Já o leite coletado no lactário apresentou contaminação em apenas 4 amostras. Estatisticamente, todas as amostras diferiram entre si.

Com relação aos microrganismos identificados pelo sistema mini Api, 83,64% das cepas isoladas a partir do leite cru, 90,91% das isoladas do leite pasteurizado e 100% das isoladas do leite coletado no lactário pertenciam ao gênero *Staphylococcus*. A espécie *S. aureus* estava presente em 29,1%; 27,3% e 60% das cepas isoladas dos leite cru, pasteurizado e do lactário, respectivamente.

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas (SET's) mostrou que, apesar da alta contaminação inicial por *S. aureus*, nenhuma das amostras apresentava-se contaminada.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Realizar trabalhos com as doadoras de leite, de modo a informar as maneiras corretas de expressar o leite e formas de evitar a contaminação deste após expressão.

Verificar a viabilidade econômica da implantação de testes de detecção de *S. aureus* do leite materno oferecido aos bebês.

Pesquisar a presença de enterotoxinas estafilocócicas em mais amostras de leite materno, por um maior período e provenientes de diferentes localidades.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)