

PERFIL MICROBIOLÓGICO DO LEITE BOVINO PRODUZIDO NA BACIA LEITEIRA DE ALAGOAS QUANTO À PRESENÇA DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO

Paulo Acioli Alves Pinto
Kellmany Lopes da Silva Santos
José Andreey Almeida Teles
Rômulo Menna Barreto Valença
Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde

RESUMO: Objetivou-se verificar o perfil microbiológico do leite bovino proveniente de quatro propriedades da bacia leiteira do Estado de Alagoas. Das 125 amostras coletadas 60 (sessenta) apresentaram crescimento bacteriano, onde destas, três (03) foram identificadas como sendo *Corynebacterium* spp., nove (09) *Bacillus* spp., dois (02) *Streptococcus* spp., cinco (05) Bacilos Gram negativos, 40 (quarenta) *Staphylococcus* e apenas em uma amostra foram isolados Cocos Gram negativos. Dentre os agentes isolados, *Staphylococcus*, coagulase positivo, foi o mais frequente, o que é mais preocupante por se tratar de agentes produtores de enterotoxinas resistentes à pasteurização e que causa intoxicação alimentar em humanos.

PALAVRAS-CHAVE: Sanidade. Bacia leiteira. Microbiologia.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the microbial profile of bovine milk from four dairy cattle herds in the state of Alagoas. Of the 125 samples collected sixty (60) showed bacterial growth, which of these, three (03) were identified as *Corynebacterium* spp., nine (09) *Bacillus* spp., two (02) *Streptococcus* spp., five (05) bacilli Gram-negative, 40 (forty) *Staphylococcus* and only in one sample were isolated Cocos Gram-negative. Among the agents that were isolated, the majority belongs to the genus *Staphylococcus*, coagulase-positive, which is more worrying because it is resistant to pasteurization an enterotoxin that causes food poisoning in humans.

KEYWORDS: Sanity. Dairy industry. Microbiology.

INTRODUÇÃO

Segundo dados do IBGE referentes à Pesquisa Pecuária Municipal de 2009, o estado de Alagoas é o que apresenta melhor desempenho em termos de produtividade de leite por animal por ano (1.486 litros) quando se refere a Norte-Nordeste, apesar de ser o detentor do menor número de cabeças do Nordeste, com 160.303 mil cabeças. Ocupa ainda o 3º lugar em produtividade nacional. O Estado ocupa a sexta posição no quesito produção de leite no Nordeste, perdendo para a Bahia (1,1 bilhão de litros), Pernambuco (788,2 milhões), Ceará (432,5 milhões), Maranhão (355 milhões) e Sergipe que apresenta seus 286,5 milhões de litros de leite por ano (SEAGRI, 2010).

De acordo com Valécio et al. (2005) a bacia leiteira alagoana está concentrada nas regiões Agreste (27,4%) e Sertão (60,6%), o que torna a atividade um dos principais contribuintes para o desenvolvimento regional, além de favorecer à geração de renda e a fixação das famílias no campo. No entanto, para aumentar a produção e o rendimento industrial da matéria-prima, o produtor de leite deve ter conhecimento dos principais fatores que determinam a qualidade do leite e, a partir disso, adotar medidas de controle higiênico-

sanitário que venham minimizar a influência de tais fatores, atendendo dessa forma o que preconiza a atual legislação.

Em 2002 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002) editou e publicou a Instrução Normativa N° 51, que determina, dentre outros aspectos, os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para o leite cru produzido no Brasil e comercializado em estabelecimentos sob fiscalização federal (SEAGRI, 2010), na tentativa de estimular o fornecimento de produtos com melhor qualidade e inócuos à saúde do consumidor. Além disso, do ponto de vista da saúde pública, um leite obtido sob condições adequadas apresenta melhor qualidade microbiológica e, conseqüentemente traz uma maior segurança alimentar para os consumidores finais.

A mastite ou mamite bovina é a inflamação da glândula mamária a qual tem etiologias diversas (bactérias, fungos, algas, etc.) além de inúmeros fatores (físicos, químicos, estresse, alimentação, etc.) causadores. Tal inflamação decorre em resposta à lesão dos tetos individualmente ou do úbere como um todo. Quanto à origem, a mastite pode ser do tipo ambiental (contraída no intervalo das ordenhas e causada por agentes oportunistas do úbere, não adaptados a sobreviver no seu interior) ou contagiosa (aqueles adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária). Um dos agentes mais frequentemente isolados como sendo o causador da mastite, destaca-se o *Staphylococcus aureus* (WATS, 1988; RADOSTITIS, 2002; LANGONI, 1998; ZSCHÖCK et al., 2000; PINHEIRO et al., 2004).

Os estafilococos estão amplamente disseminados no ambiente, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios, nos quais colonizam pele e mucosas. Este micro-organismo causa uma série de infecções que variam desde lesões purulentas e localizadas na pele até infecções generalizadas (ROITMAN ET al., 1998).

Staphylococcus coagulase positivo são micro-organismos de importância em alimentos por apresentarem risco para saúde pública pela produção de enterotoxinas. Em condições favoráveis o micro-organismo multiplica-se no alimento, até alcançar altas cargas, produzindo as enterotoxinas, sem que seja alterado significativamente a cor, o aroma e o sabor, causando intoxicação alimentar (SANTOS, 1997). Os principais sintomas dessa intoxicação são náuseas, vômito e diarreia, e em idosos e crianças a intoxicação estafilocócica pode ser fatal, caso esse indivíduo apresentem outras doenças (CLEMENTE ET al., 2003).

Levando em consideração os parâmetros mencionados anteriormente, bem como os prejuízos econômicos que podem ser gerados em decorrência de uma qualidade inferior do leite e considerando ainda a importância que representa a bacia leiteira do estado de Alagoas, essa pesquisa objetiva verificar o perfil microbiológico do leite bovino frente à presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, avaliar ainda o aspecto sanitário no processo de obtenção do mesmo, assim como outros agentes etiológicos envolvidos na mastite bovina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As 125 (cento e vinte e cinco) amostras de leite foram oriundas das cidades de Minador do Negrão-AL e Batalha-AL em quatro (04) propriedades, sendo duas (02) em cada um dos municípios. Os espécimes foram obtidos diretamente dos tetos dos animais enquanto eram ordenhados pelo tratador, sem que fosse dispensado nenhum tipo de assepsia. Posteriormente foram armazenados em tubos de ensaio com tampa e esterilizados, identificados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo baterias de gelo reciclável. Em seguida o material foi encaminhado para processamento no Laboratório de Microbiologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesmac, localizado no município de Marechal Deodoro-AL.

As amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar sangue ovino (5%) desfibrinado e incubadas em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 48 horas.

Posteriormente as colônias que surgiram sobre o meio de cultura foram submetidas à identificação tintorial pelo método de Gram. As colônias confirmadas como sendo pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram repicadas para o caldo de infusão cérebro e coração (BHI), as quais após passar por incubação a 37°C por 24h foram submetidas ao teste da coagulase. A diferenciação entre os gêneros de microorganismos Gram Positivos foi feita segundo a ANVISA (2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 125 (cento e vinte e cinco) amostras cultivadas, 60 (48%) apresentaram crescimento bacteriano, das quais, três (03) foram identificadas como sendo *Corynebacterium* spp. (2,4%), nove (09) *Bacillus* spp. (7,2%), dois (02) *Streptococcus* spp. (1,6%), cinco (05) Bacilos Gram-negativos (4%), 40 (quarenta) *Staphylococcus* (32%) e apenas em uma amostra foram isolados Cocos Gram-negativos (0,8%). No gráfico 1 é possível visualizar o percentual de amostras que apresentaram crescimento bacteriano conforme o tipo de gênero.

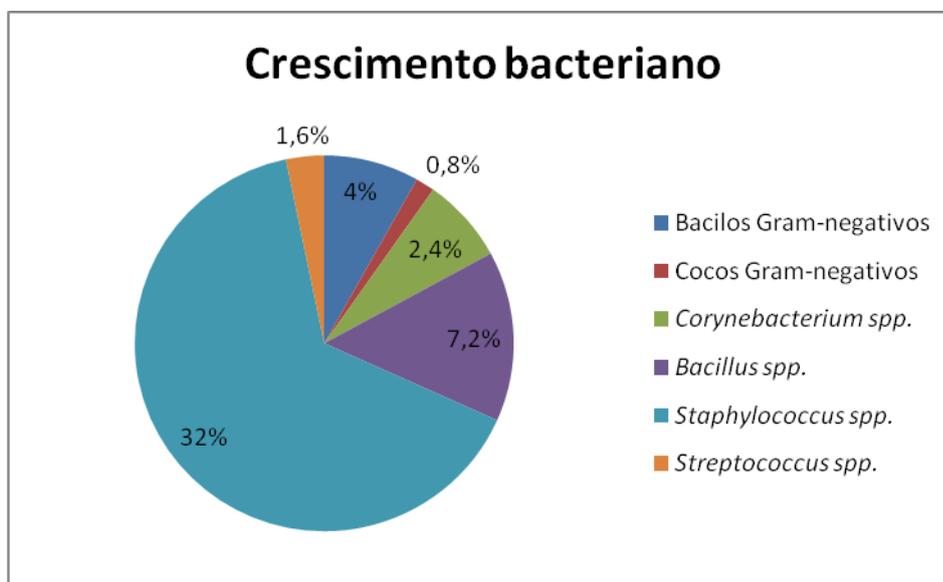


Gráfico 1: Percentual de amostras que apresentaram crescimento bacteriano conforme o tipo de gênero.

Fonte: Dados da pesquisa.

Do total de amostras de *Staphylococcus* spp., 57,5% foram positivas para o teste da coagulase. Os resultados encontrados por Lopes e Stamford (1997) que ao analisarem 88 cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite bovino cru, detectaram 54,5% de positividade para o teste da coagulase, são semelhantes ao encontrado nesta pesquisa. Almeida (1997), em pesquisa realizada no ano de 1997 em Garanhuns, estado de Pernambuco, concluiu que das 358 amostras de leite analisadas por ele, 76,5% foram positivas para *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

Stamford et al. (2006) confirmam que quando há uma prevalência de *Staphylococcus aureus* em uma criação bovina, os animais tendem a apresentar-se portando a mastite clínica ou sub-clínica apesar de este agente fazer parte da microbiota normal do animal. Todavia, esses mesmos autores sugerem o *Staphylococcus* Coagulase Positiva como sendo o agente etiológico da mastite sub-clínica no rebanho leiteiro do Estado de Pernambuco.

Quanto à presença de *Corynebacterium*, Victoria et al. (2005) menciona que esse agente já foi considerado um comensal do úbere de bovinos e, portanto, apresentando uma importância epidemiológica secundária quanto agente etiológico da mastite.

Blood e Radostits et al. (1991) descrevem os microrganismos do gênero *Bacillus* como sendo agentes oportunistas em casos de mastite e que a sua presença deve ser associada a fatores predisponentes.

No tocante ao percentual de *Streptococcus* encontrados nas amostras que apresentaram crescimento, estes possuem uma significativa importância como agente etiológico das mastites em bovinos e por se tratar de um micro-organismo obrigatório da glândula mamária, ele pode sobreviver por longo período causando danos ao animal hospedeiro e comprometendo a qualidade microbiológica do leite (OLIVER, 1984; KEEFE, 1997). Nesse sentido, devido à alta contagiosidade do referido agente, um rebanho infectado normalmente apresenta alta taxa de prevalência (GONZALEZ ET al., 1986).

Quanto aos agentes Gram negativos que foram isolados na pesquisa, estes normalmente estão envolvidos nas mastites ambientais e a sua presença é sugestiva de falhas no manejo sanitário, principalmente no que diz respeito ao intervalo das ordenhas (BARBOSA, 2003).

Nessa pesquisa nenhuma das propriedades estudadas seguiam os procedimentos mínimos de higiene para produção, identidade e qualidade do leite conforme preconiza a Instrução Normativa 51 de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002).

No tocante às medidas de controle da mastite, nenhuma das propriedades realizava testes de rotina para diagnóstico de mastite sub-clínica como o Califórnia Mastitis Test – CMT e teste da Caneca Telada para a identificação de quadros de mastite clínica, o que colabora segundo Riet-Correa (2007) com o aumento da disseminação da doença entre os animais.

Figueiredo (1995) realizou pesquisa com mastite e inferiu que os resultados negativos obtidos pelo teste do CMT possuem um elevado nível de confiança, sendo, portanto, muito úteis nos trabalhos a campo. No entanto, Costa et al. (2001) discordam dessa afirmação uma vez que ao analisarem 8.116 amostras de quartos mamários negativos no teste de CMT, obteve 45,1% de amostras positivas quando do cultivo microbiológico.

Em todas as propriedades a ordenha era realizada manualmente e nas unidades criadoras localizadas na cidade de Minador do Negrão-AL o ordenhador mantinha sempre o bezerro ao pé. Fato esse que é posto por Radostits et al. (2002), Zegarra et al. (2007), e Brandão et al. (2008), como sendo um eficiente redutor na incidência de mastite em um rebanho e ao mesmo tempo é contradito por outros pesquisadores que obtiveram resultados contrários e sugerem que mais estudos sejam realizados na perspectiva de que tal informação seja elucidada (OLIVER, 1984).

Os ordenhadores em três das propriedades não possuíam bons hábitos de higiene, o que faz com que haja um aumento significativo dos casos de mastite no rebanho, principalmente a do tipo contagiosa, a qual tem como agente causador micro-organismos Gram positivos, dentre eles os do gênero *Staphylococcus*, possibilidade essa reforçada pela não assepsia dos tetos, em nenhuma das unidades de criação.

Em apenas uma das propriedades o local de ordenha possuía piso de alvenaria, contudo, durante a obtenção do leite as vacas ficavam aglomeradas e sem o bezerro ao pé.

Nesse sentido, Costa et al. (1985), Laffranchie et al. (2001), Ferreira et al. (2007), e Oliveira et al. (2009), constataram que a elevada prevalência da mastite em um rebanho deve-se à falta de higiene do ordenhador e dos instrumentos utilizados para a obtenção do leite, assim como a assepsia da sala de ordenha.

De acordo com resultados apresentados por Madigan et al. (2004), os manipuladores representavam as principais fontes de contaminação do leite uma vez que podem veicular dentre outros agentes o *Staphylococcus aureus*, já que o habitat mais comum dessas bactérias é o trato respiratório superior, especialmente a narina anterior, bem como a superfície da pele.

Jay (2005) em pesquisa realizada no ano de 2005 relata que as espécies de estafilococos são hospedeiro-adaptadas e, grande parte destas habita somente humanos. Normalmente a maioria das espécies localiza-se nas aberturas naturais de humanos como é o caso das narinas, axilas e nas virilhas. Contudo, as duas fontes mais importantes de contaminação para alimentos são as fossas nasais, mãos e braços de manipuladores de alimentos portadores do agente.

CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos, pode-se inferir que a falta de medidas higiênicas por parte do ordenhador no processo de obtenção do leite, compromete bastante as características microbiológicas deste produto, além de tornar-se um veiculador de agentes infecciosos ao consumidor final, principalmente ao ser ingerido *in natura*, constituindo-se também como uma matéria-prima de baixa qualidade, o que promove uma redução significativa no valor agregado dos produtos derivados.

Dentre os agentes que foram isolados, pode-se notar que a maioria pertence ao gênero *Staphylococcus*, mais precisamente ao grupo dos *Staphylococcus* Coagulase Positivo, o que é mais preocupante por se tratar de um agente capaz de produzir enterotoxinas resistentes à pasteurização e que causa intoxicação alimentar em humanos.

REFERÊNCIAS

1. SEAGRI. Secretaria de Estado da Agricultura e do Desenvolvimento Agrário do Estado de Alagoas. Projetos e ações visam melhorar qualidade e aumentar produtividade do leite em Alagoas. [Acesso em 20 de abril de 2010]. Disponível em: <http://www.agricultura.al.gov.br/noticias/projetos-e-aco-es-visam-melhorar-qualidade-e-aumentar-produtividade-do-leite-em-alagoas>.
2. Valécio M, Lopes RB, Lima LC. Alagoas: Estratégias de Desenvolvimento; 2005. [Acesso em 20 de abril de 2010]. Disponível em: www.investmentosalagoas.al.gov.br/ed/estrategias/pdf.
3. BRASIL. Instrução Normativa n°. 51, de 20 de setembro de 2002. A prova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, Brasília. Sept. 2002; 1: 13.
4. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 1988; 16: 41-66.
5. Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002: 1737.

6. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina. *Revta Bras. Med. Vet.* 1998; 20: 204-210.
7. Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int. Dairy J.* 2000; 10: 569-574.
8. Pinheiro SME, Cunha MLRS, Elias AO, Cassiano V, Langoni H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2004; 41: 320-326.
9. Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo, Manole. 1988; 1: 186.
10. Santos WLM. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servida em restaurantes industriais da cidade de Belo Horizonte. *Revista Higiene Alimentar.* 1997; 11 (40): 26-30.
11. Clemente MG, Valle RHP, Abreu LR. *Staphylococcus* em queijos fabricados com leite cru e pasteurizado. *Revista Higiene Alimentar.* jan/fev 2003; 17 (104/105): 38-39.
12. *Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica*. Agência Nacional de Vigilância sanitária. 2004.
13. Lopes ACS, Stamford TLM. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento do leite pasteurizado. *Arquivos Latinoamericanos de Nutrición.* 1997; 47 (43): 67-371.
14. Almeida MAC. Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* na microrregião de Garanhuns. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1997: 48.
15. Stamford TLM, Silva CGM, Mota RA, Cunha-Neto A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas.* jan-mar. 2006; 26(1): 41-45.
16. Victória C, Da Silva AV, Elias AO, Langoni H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. *Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia.* 2005; 8, (2). 161-164.
17. Blood DC, Radostists, OM. Mastite. In: Blood DC; Radostists OM. (Eds.). *Clínica veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991; 423-470.
18. Oliver SP, Mitchell BA. Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. *J. Dairy Sci.* 1984; 67: 2346-440.
19. Keefe GP. *Streptococcus agalactiae*: A review. *Can. Vet. J.* 1997; 38: 429-437.
20. González RN, Jasper DE, Bushnell RB, Farver TB. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986; 189. (4): 442-445.

21. Barbosa RS. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Agrociência. jul-set. 2003; 9. (3): 287-290.
22. Riet-Correa F, Lúcia SA, Antônio ALR, Renato JBJ. Doenças de Ruminantes e Equinos. 3ª ed. Santa Maria: Editora Pallotti, 2007; 1: 359-372.
23. Figueiredo JB. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. 1995; 11: 176.
24. Costa EO, Ribeiro AR, Garino JF. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Soc.Bras.Med.Vet., Salvador-BA. 2001; 28: 159.
25. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Clínica Veterinária Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002; 1737.
26. Zegarra JJQ, Oliveira BCRS, Silva RA, Carneiro OB, Botteon RCCM, Botteon PTL. Aspectos da produção leiteira em pequenas unidades de produção familiar no assentamento Mutirão Eldorado em Seropédica, Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 2007; 14. (1): 12-18.
27. Brandão FP, Ruas JRM, Silva Filho JM, Borges LE, Ferreira JJ, Carvalho BC, Alberto Marcatti Neto AM, Amaral R. Influência da presença do bezerro no momento da ordenha sobre o desempenho produtivo e incidência de mastite subclínica em Vacas mestiças holandês-zebu e desempenho ponderal dos bezerros. Revista Ceres. 2008; 55. (6): 525-531.
28. Costa EO, Carvalho VM, Coutinho SD, Castilho W, Caramori LFL. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no estado de São Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira. 1985; 5 (4): 117-120.
29. Laffranchi A, Muller EE, Freitas JC, Preto GLG, Dias J, Salvador R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. Ciência Rural. 2001; 31 (6): 1027-1032.
30. Ferreira JL, Lins JLFHA, Cavalcant TV, Macedo NA, Borjas AR. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. Ciência Animal Brasileira. 2007; 8 (2): 261-266.
31. Oliveira AA, Melo CB, Azevedo HC. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. Ciência Animal Brasileira. 2009; 10(1): 226- 230.
32. Madigan MT, Martinko JM. Parker JB: Biology of Microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall, New Jersey. 2004; 608.
33. Jay MJ. Microbiologia de alimentos. 6ed- Porto Alegre. Art Méd. 2005; 711.