

## ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE LEITE, FEZES DE VACAS E DE AVES SILVESTRES EM LEITARIAS NA REGIÃO DE PELOTAS

LUIZ GUSTAVO BACH<sup>1</sup>; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES<sup>2</sup>; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA<sup>3</sup>; LOUISE MACIEL FERNANDES<sup>4</sup>; CELINA NUNES EBERSOL<sup>5</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas –debora.rsilveira@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas –louise\_maciel@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – celinanunesebersol@outlook.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Leite é uma fonte importante de alimentação para os seres humanos. Apresenta considerável valor nutritivo e por isso também é um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos, sejam eles patogênicos ou não. É cada vez mais evidente a preocupação com aspectos higiênico-sanitários durante sua produção, tendo em vista que esse alimento pode carregar microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Segundo GRACINDO; PEREIRA (2010), o leite tem sua qualidade determinada por parâmetros microbiológicos e físico-químicos. O manejo sanitário e exercício de ordenha são fatores cardeais para as alterações da qualidade microbiológica.

*Staphylococcus* é um gênero bacteriano de grande importância devido sua capacidade de produzir intoxicação alimentar, resultante do consumo de enterotoxinas pré-formadas por ele (HENNEKINNE et al. 2012). São microrganismos que podem ser encontrados na pele e mucosa nasal do homem e de outros animais, além disso, nos equipamentos e materiais de ordenha. (PHILPOT; NICKERSON, 2000). *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria transmitida ao homem por alimentos contaminados (FRANCO; LANDGRAF, 2003) como, por exemplo, leite e seus derivados (YUCEL; ULUSOY, 2006; HANIFIAN; KANI, 2012). Esse patógeno apresenta a capacidade de sobreviver a baixas temperaturas (HANNA et al. 1997), ou seja, se mantém viável durante os métodos de conservação de alguns alimentos refrigerados. A doença causada por esse agente é a terceira maior zoonose da Europa (EUROPEAN, 2012). *Listeria monocytogenes* é responsável pela transmissão de listeriose, uma infecção muito importante transmitida através de alimentos contaminados, da qual morrem cerca de 260 das 1600 pessoas acometidas por ano nos Estados Unidos (CDC, 2016). Todos estes microrganismos são passíveis de transmissão também através do contato direto ou indireto com as fezes de animais contaminados.

O Brasil possui uma das mais ricas avifaunas do mundo (PIACENTINI et al. 2015). Segundo HALL e SAITO (2008), aves silvestres têm a capacidade de albergar microrganismos patogênicos e transmiti-los a outros animais e humanos.

O objetivo do presente trabalho foi isolar *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* de leite, fezes de vaca e também fezes de aves silvestres em torno de leitarias da região sul do Rio Grande do Sul.

### 2. METODOLOGIA

Para captura das aves silvestres contou-se com auxílio de duas redes de neblinas de 12 metros cada, sendo propositalmente colocadas em regiões com maior tráfico desses animais nas leitarias. A apanha das aves foi realizada durante oito horas semanais, sendo quatro horas no primeiro dia, à tarde, e quatro na manhã do segundo dia. A coleta de material fecal foi realizada com a introdução de zaragatoas estéreis na cloaca das aves. As aves foram identificadas taxonomicamente por seu gênero e espécie com base na Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (PIACENTINI et al. 2015). Para evitar que as aves fossem coletadas mais de uma vez em caso de recaptura das mesmas, elas foram marcadas no dorso com tinta inodora não tóxica (All-Wheather, U.S.A.) e, após isso, foram imediatamente soltas. As amostras de fezes de vacas foram obtidas com introdução de zaragatoas estéreis no reto dos animais. Todas as zaragatoas com as amostras foram acondicionadas em ágar de transporte semissólido Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia). A coleta de leite foi realizada com uso de vasilhames estéreis no momento da ordenha, obtendo-se um total 100 mL de leite de cada vaca. Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo retornável.

A determinação da presença de *Staphylococcus aureus* foi realizada conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), com modificações. Uma alíquota de leite e as zaragatoas com fezes foram semeadas em ágar Baird-Parker (Himedia) e incubadas a 37°C por 24 horas para posterior realização da prova da coagulase, que consiste na combinação de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL de plasma equino e incubação a 37°C por 6 horas para observação de coagulação.

Para *Yersinia*, as zaragatoas com as fezes foram semeadas por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan) e incubadas a 30°C por 24 horas. Para análise das amostras de leite, 25 mL foram adicionados a 225 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia), para pré-enriquecimento por 30 dias a 4°C e demais procedimentos segundo TAVARES et al. (2017). Para identificação da espécie *Y. enterocolitica* foi realizado teste de motilidade em ágar Sulfato Indol Motilidade (SIM, Micromed, São Paulo, Brasil), como descrito pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (WEAGANT et al. 2017).

Para pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizado enriquecimento primário das zaragatoas com fezes em 10 mL caldo Listeria (UVM, University Vermont medium) e, para o leite, 25 mL de leite em 225 mL do mesmo caldo, incubando todos a 30°C por 24 horas e demais procedimentos segundo BRASIL (2003).

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragatoas foram acondicionadas em tubos de ensaio com 10 mL de APT e 25 mL do leite adicionado a 225 mL de APT. O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella* conforme recomendações da FDA (ANDREWS et al. 2018).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitas coletas em cinco propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul, obtendo-se um total de 75 amostras de fezes de vaca, 75 de leite e 88 de aves silvestres, sendo essas últimas representadas também por um ninho localizado na sala de ordenha de uma propriedade.

Os pássaros coletados com maior frequência foram: 27 (30,68%) *Turdus rufiventris* (Sabíá-laranjeira), 12 (13,63%) *Columbina talpacoti* (Rolinha-roxa), 10 (11,36%) *Furnarius rufus* (João-de-barro), 10 (11,36%) *Columbina picui* (Rolinha-picuí) e sete (7,95%) *Agelaioides badius* (Asa-de-telha).

Foram obtidos nove isolados de *S. aureus*, um (1,33%) de fezes de vaca, cinco (6,66%) de leite e três (3,40%) de fezes de aves silvestres. Das fezes de pássaros positivos para *S. aureus*, dois eram *T. rufiventris* e um *Cyanoloxia brissoni* (Azulão).

Já de *Y. enterocolitica* foram obtidos quatro isolados, sendo um (1,33%) de fezes de vaca, um (1,33%) de leite e dois (2,27%) de fezes de aves silvestres. As espécies de aves positivas para essa bactéria foram *T. rufiventris* e *C. picui*.

Não foram obtidos isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. das amostras testadas.

Um estudo realizado por HALL; SAITO (2008) analisou 3.772 causas de mortalidade de aves silvestres e 186 (5,4%) delas estavam relacionadas com *Salmonella* spp. Esse resultado remete a capacidade desses animais de albergar microrganismos patogênicos e transmiti-los para outros animais e para humanos. Assim também (SILVA et al. 2011) encontraram 2 isolados de *Staphylococcus aureus* em 51 aves do litoral de Santa Catarina, Brasil.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que leite, fezes de vaca, *T. rufiventris* e *C. picui* podem albergar tanto *S. aureus* quanto *Y. enterocolitica*

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 15 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, p.14-51. 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). ***Listeria (Listeriosis)***. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/>>. Acesso em: 15 set. 2018.

EUROPEAN Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, v.10, 2012. 442p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2003.

GRACINDO, A.P.A.C.; PEREIRA, G.F. **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: EMPARN, 2010. 36p

HALL, A. J.; SAITO, E.K. Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004. **Journal of wildlife diseases**, v.44, n.3, p.585-593, 2008.

HANIFIAN, S.; KHANI, S. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p.89-92, 2012.

HANNA, M.O.; STEWART, C.; CARPENTER, L. ANDERZANT, C. Effect of heating, freezing and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organisms from meat. **Journal of Food Protection**, v.40, p.689-692, 1977.

HENNEKINNE, J.A.; BUYSER, M.L.D; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.815–836, 2012.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Milkbizz, 2002.192p

PIACENTINI, V.Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C.E.; MAURÍCIO, G.N.; PACHECO, J.F.; BRAVO, G.A.; BRITO, G.R.R.; NAKA, L.N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L.F.; BETINI, G.S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A.C.; LIMA, L.M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F.R.; BENCKE, G.A.; COHN-HAFT, M.; FIGUEIREDO, L.F.; STRAUBE, F.C.; CESARI, E. Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.23, n.2, p.91-298, 2015.

SILVA, M.A.C.; MANOEL, F.C.; KRUEGER, J.; BARREIROS, M.A.B.; BRANCO, J.O. Identificação de bactérias potencialmente patogênicas a humanos presentes em *Sula leucogaster* (Suliformes: Sulidae), no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.19, n.4, p.520-524, 2011.

TAVARES, A.B.; SOUZA, A.I.A.; DULAC, C.F.; MOREIRA, L.M.; DOMINGUEZ, L.; GONZALEZ, H.L.; CERESER, N.D.; TIMM, C.D. Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Pelotas, v.69, n.2, p.483-490, 2017.

WEAGANT, S.D.; FENG, P.; STANFIELD J.T. *Yersinia enterocolitica*. In: U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual**, 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 13 set. 2018.

YUCEL, N.; ULUSOY, H.A. Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, v.17, p.383-388, 2006.