

Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado

Antimicrobial resistance of coliform isolates from expressed human milk

Franz Reis Novak ¹
João Aprígio Guerra de Almeida ¹
Marise Dutra Asensi ²
Bianca Aguiar de Moraes ²
Dália dos Prazeres Rodrigues ²

¹ Banco de Leite Humano, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Rui Barbosa 716, Rio de Janeiro, RJ 22250-020, Brasil. novak@iff.fiocruz.br
² Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4300, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil.

Abstract *The dispersion of potentially pathogenic, antibiotic-resistant microorganisms via expressed human milk can be considered a risk factor. The aim of this study was to contribute to a better understanding of coliform isolates from expressed human milk and their antimicrobial resistance profiles. The sampling scheme followed a totally randomized design, using 837 samples of expressed human milk. Of these, 71 (8.48%) were identified as contaminated with total coliforms, although in none of the samples did the population exceed 1.0×10^3 MPN/ml. Most of the microorganisms isolated (91.6%) belonged to only two species, Enterobacter cloacae and Klebsiella pneumoniae, which when subjected to antibiograms, revealed that several strains showed prior resistance to some of the antimicrobials tested. Coliforms may grow in expressed human milk if it is improperly stored, depleting protection factors and reducing the milk's nutritional value.*

Key words Human Milk; Enterobacteriaceae; Microbial Drug Resistance

Resumo *A veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos, resistentes aos antibióticos, por meio de leite humano ordenhado, pode ser um fator de risco potencial. Este estudo teve como objetivo contribuir para um melhor conhecimento dos coliformes isolados de leite humano ordenhado (LHO) e de seu perfil de resistência a antimicrobianos. Seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado, utilizando 837 amostras de LHO, nas quais 71 (8,48%) estavam contaminadas com coliformes totais, cuja contagem em nenhuma das amostras ultrapassava $1,0 \times 10^3$ NMP/ml. A maioria dos microrganismos isolados (91,6%) pertencia a apenas duas espécies, Enterobacter cloacae e Klebsiella pneumoniae. As 71 cepas de coliformes apresentavam resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Conclui-se que o LHO coletado e armazenado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pode apresentar coliformes, que desgastam os fatores de proteção, reduzem o valor nutricional e a qualidade do produto.*

Palavras-chave Leite Humano; Enterobacteriaceae; Resistência Microbiana a Drogas

Introdução

As mudanças na microbiota que coloniza o trato gastrointestinal guardam uma relação direta com as variações alimentares observadas pelo lactente e a funcionalidade do trato gastrointestinal (Rubaltelli et al., 1998; Yoshika et al., 1983). Alterações quali-quantitativas nesta população, podem desencadear doenças diarreicas bacterianas, associadas ou não à presença de enterotoxinas, com conseqüente má absorção dos nutrientes, perda de líquidos, desnutrição e em alguns casos, o óbito (Leal et al., 1988; Simhon et al., 1982).

Desta forma, as infecções que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida, se constituem numa das mais importantes causas de elevação dos índices de morbi-mortalidade entre lactentes. A freqüência e a severidade destas infecções por bactérias Gram-negativas, influenciadas pela imaturidade do sistema imunológico, são uma peculiaridade desta faixa etária (Fagundes Neto et al., 1989).

O leite humano funciona como um suplemento de fatores de proteção para o lactente, além de restringir e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas. A efetividade dessa proteção será fundamental naquelas comunidades de baixo nível sócio-econômico e condições sanitárias inadequadas, associadas ao estado fisiológico e grau de prematuridade de seu receptor (Stevenson et al., 1985).

Por definição, coliformes são bacilos aeróbicos e/ou anaeróbios facultativos, Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás. Este grupo inclui vários gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae, com potencial variado de patogenicidade para o homem. Os gêneros clássicos deste grupo são *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (Speck, 1984). O habitat natural e principal nicho das enterobactérias é o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente (ABNT, 1991; Speck, 1984). Assim, a presença dessas bactérias no leite humano indica que o mesmo entrou em contato, de forma direta ou indireta, com material de origem fecal.

A presença de *Escherichia coli* é utilizada como um indicador clássico de contaminação fecal, cuja presença está associada, com certa probabilidade, a existência de bactérias patogênicas, normalmente mais difíceis de serem detectadas (Leyva et al., 1991). O gênero *Enterobacter*, escasso nas fezes, constitui um importante indicador de contaminação ambiental quando em ausência de *E. coli* (Leyva et al., 1991). As espécies de coliformes não envolvi-

das em processos patogênicos são morfológica e bioquimicamente indistinguíveis das patogênicas (Ciampi et al., 1987).

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de isolar e identificar bactérias Gram-negativas fermentativas selecionadas pelo teste de Colimetria, aplicado nas amostras de leite humano ordenhado (LHO), visando desta forma contribuir para um melhor conhecimento desta microbiota e de seu perfil de resistência a antimicrobianos.

Material e métodos

Amostragem

Foram analisadas 837 amostras de LHO, oriundas do Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (BLH/IFF/FIOCRUZ), recebidas de coleta domiciliar, no período de junho de 1998 a dezembro de 1999.

Isolamento primário

O método empregado foi o teste de Colimetria (pesquisa de coliformes totais) descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Speck, 1984). A partir dos tubos com crescimento em *Caldo Bile Verde Brilhante Lactose 2%* (Merck), empregados nos testes confirmatórios para se determinar o Número Mais Provável de Coliformes totais por ml de LHO-NMP/ml (ABNT, 1991; Speck, 1984), foram feitas sementeiras em *Agar MacConkey* (Difco) e incubando-se a 35°C por 24 horas. Em seguida foram selecionadas colônias típicas de cada placa, e posteriormente mantidas em tubos de *Agar Nutriente* (Difco), após incubação a 35°C por 24 horas.

Identificação

As culturas obtidas foram submetidas a coloração pelo método de Gram e identificadas utilizando-se métodos clássicos, segundo Costa & Hofer (1972), e o sistema *Crystal* comercializada pela BBL-Becton & Dickinson.

Antibiograma

Os testes de difusão de disco foram avaliados segundo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1993), empregando-se os seguintes agentes antimicrobianos fornecidos pela Cecon: ampicilina (AP) – 10mcg; cefalotina (CF) – 30mcg; cefo-

xitina (CFO) – 30mcg; ceftriaxona (CRO) – 30mcg; cefuroxima (CRX) – 30mcg; sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) – 1,25/23,75 mcg; imipenem (IMP) – 10mcg; gentamicina (GN) – 10mcg; ampicilina (AK) – 30mcg; cloranfenicol (CP) – 30mcg; tetraciclina (TC) – 30mcg; ciprofloxacina (CIP) – 5mcg. Sendo empregadas cepas padrão de microrganismos como controles.

Resultados

Das 837 amostras de LHO analisadas, foram identificadas 71 (8,48%) contaminadas com coliformes, porém, em nenhuma das amostras a população ultrapassou $1,0 \times 10^3$ NMP/ml (Figura 1). Após a identificação, os resultados obtidos revelaram a presença de três gêneros e cinco espécies da família Enterobacteriaceae nas 71 cepas estudadas (Figura 2). A maioria dos microrganismos (65 – 91,6%) pertenciam a apenas duas espécies, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo discreta a ocorrência de *E. coli* (3 – 4,2%).

Quanto a suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 1), verificou-se a resistência à ampicilina em 68 cepas (95,8%), cefalotina em 44 (67,0%), cefoxitina em 42 (59,1%), cefuroxima 6 (8,4%), sulfametoxazol-trimetoprim em 2 (2,8%) e ceftriaxona em 1 (1,4%).

Discussão

O LHO obtido de doadoras saudáveis é livre de microrganismos patogênicos. Estes, quando ocorrem, encontram-se associados a fontes externas de contaminação. Entre os contaminantes externos, os coliformes ocupam lugar de destaque devido ao seu próprio significado e a elevada probabilidade de sua ocorrência quando o leite é submetido a condições higiênicas sanitárias insatisfatórias (Almeida, 1998; Salles & Goulart, 1997).

Os microrganismos do grupo coliformes são utilizados como o principal indicador de qualidade sanitária para o LHO pasteurizado. No Brasil, foi estabelecido como padrão de qualidade microbiológica a ausência de coliformes totais em 1 ml do produto (MS, 1995). Como na maioria dos enteropatógenos a dose infectante para criança é superior a 10^3 UFC/ml (Brayan, 1978), pode-se concluir que o padrão em uso apresenta um elevado grau de segurança para os receptores de LHO.

As 71 cepas foram classificadas como: *E. cloacae* (56,4%), *K. pneumoniae* (35,2%), *E. coli* (4,2%), *Enterobacter sakazakii* (2,8%) e *Entero-*

Figura 1

Distribuição de freqüência dos coliformes (NMP/ml) em 837 amostras de leite humano ordenhado.

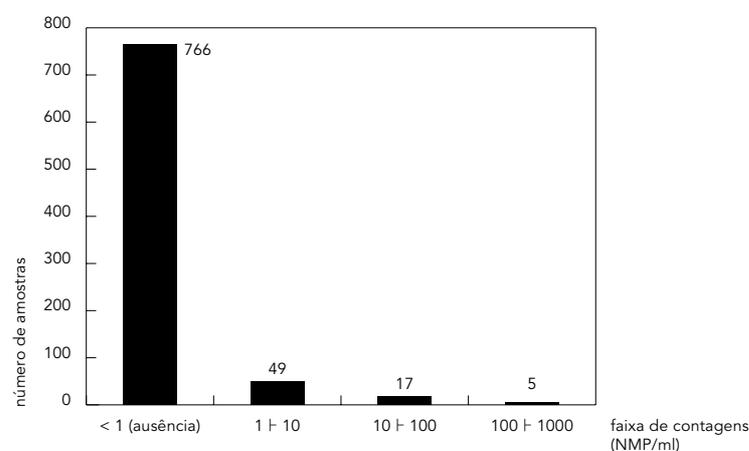


Figura 2

Caracterização das espécies de coliformes nas amostras de leite humano ordenhado.

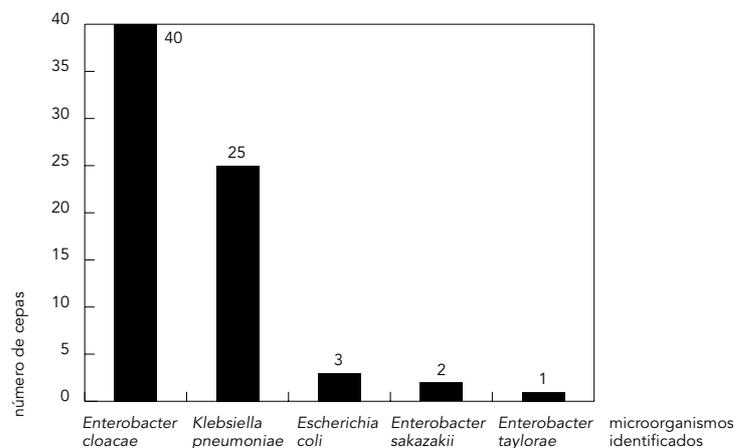


Tabela 1

Perfil de resistência a 12 antimicrobianos das 71 espécies de coliformes isoladas de leite humano ordenhado.

Antimicrobianos	Espécies										Total	
	<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. sakazakii</i>		<i>E. taylorae</i>		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	25	100,0	39	97,5	1	33,3	2	100,0	1	100,0	68	95,8
Cefalotina	2	8,0	38	95,0	1	33,3	2	100,0	1	100,0	44	67,0
Cefoxitina	2	8,0	36	90,0	1	33,3	2	100,0	1	100,0	42	39,1
Cefuroxima	0	0,0	4	10,0	0	0,0	1	50,0	1	100,0	6	8,4
Sulfamet.-Trimetoprim	0	0,0	0	0,0	2	66,6	0	0,0	0	0,0	2	2,8
Ceftriaxona	0	0,0	1	2,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4

Todas as amostras foram sensíveis à Amicacina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Imipinem e Tetraciclina.

bacter taylorae (1,4%). Estes resultados são perfeitamente compatíveis com os dos coliformes fecais (Varnam & Evans, 1991), admitindo-se portanto o contato direto ou indireto das amostras com material de origem fecal.

A baixa ocorrência de *E. coli* entre as espécies identificadas é um fato que merece destaque. No âmbito do controle de qualidade microbiológico do LHO, persiste ainda uma antiga tendência de tratar o produto como um material clínico e como tal, praticar técnicas que se fundamentam no cultivo de *E. coli* como indicador sanitário de maior importância. Nessa perspectiva, os resultados evidenciam o elevado grau de probabilidade de se aceitar um produto como próprio para consumo, sem que de fato esteja, uma vez que outras bactérias que compõem o grupo se fizeram presente em números maiores.

Os resultados evidenciam ainda o elevado nível de risco quando se trabalha com produto cru, ou seja, sem pasteurização. Recentemente, cepas de *E. sakazakii* começaram a ser associadas à infecção hospitalar em neonatos e o veículo da contaminação responsável foi uma fórmula infantil (Simmons et al., 1989). Tal microrganismo, apesar de pouco freqüente, foi isolado de 0,23% das amostras de LHO analisadas. A elevada incidência de *E. cloacae* (56,4%) reforça a tese de que as amostras podem ter sido obtidas e/ou estocadas sob condições higiênicas insatisfatórias.

As cepas isoladas apresentaram resistência a vários antimicrobianos, corroborando os achados de Neu (1992), que evidenciou resistência a antimicrobianos em 45% dos patógenos oportunistas como *E. coli*, *Klebsiela* sp., *Serratia* sp. e *Proteus* sp. Ressalta-se que 36 das 71 cepas (50,7%) eram multirresistentes para AP, CF, e CFO e 5 (7,0%) para AP, CF, CFO, e CRX. O uso

extensivo e inapropriado de antibióticos na comunidade, nos hospitais e para fins veterinários tem contribuído para o aumento da multirresistência antimicrobiana (Brock et al., 1994). Estes resultados alertam para o problema da propagação de cepas de microrganismos resistentes a antibióticos através do leite humano ordenhado, provavelmente decorrente da prescrição seletiva de antimicrobianos usados sobre a microbiota normal das doadoras (Dias & Hofer, 1985).

Apesar disso, durante o aleitamento humano não se observam sinais da transferência de microrganismos da mãe para filho, provavelmente devido ao discreto número de microrganismos, sua baixa virulência, além dos fatores de proteção carregados pelo leite humano ou por uma associação dos mesmos (Ibhanesebhor & Otobo, 1996). Ressalta-se ainda, que tais microrganismos são contaminantes secundários e como tal, não se configuram em um problema na amamentação direta ao seio. As elevadas taxas de infecção observadas após o desmame, podem ser resultantes da supressão dos fatores de proteção materna e da ingestão elevada de microrganismos com a alimentação (Fagundes Neto, 1994). Por fim, vale destacar que a presença de microrganismos do grupo coliformes indica sempre a inobservância dos procedimentos higiênicos-sanitários recomendados pela Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH), o que se traduz em um fator de risco para o consumidor e desqualificando-o para o consumo (RNBLH, 2000).

Referências

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1991. *Bactérias Coliformes Totais, Coliformes Feccais e Escherichia coli em Alimentos – Determinação do Número Mais Provável (NMP)*. Rio de Janeiro: ABNT.
- ALMEIDA, J. A. G., 1998. *Amamentação: Repensando o Paradigma*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- BRAYAN, F. L., 1978. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *Journal of Food Protection*, 41:816-827.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. & MARTINKO, J. M. S., 1994. *Biology of Microorganisms*. 17th Ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall.
- CIAMPI, P. L.; OJEDA, S. A. & PINTO, V. O., 1987. Isolation and identification of enterobacteria in lettuces (*Lactuca sativa*) cultivated in the city of Valdivia, Chile. *Revista de Microbiologia*, 18:103-108.
- COSTA, G. A. & HOFER, E., 1972. *Isolamento e Identificação de Enterobactérias*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- DIAS, J. C. A. R. & HOFER, E., 1985. Gram-negative bacteria resistant to antibiotics in foods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:411-421.
- FAGUNDES NETO, U., 1994. Diarréia aguda. In: *Infecologia Pediátrica* (C. K. Farhat, E. S. Carvalho, L. H. F. R. Carvalho & R. C. M. Succi, org.), pp. 127-144, São Paulo: Editora Atheneu.
- FAGUNDES NETO, U.; REIS, J. C.; SABBAG, N. A. & OLIVA, C. A. G., 1989. Acute diarrhea: Clinical evaluation in children. *Revista Paulista de Pediatria*, 6:27-34.
- IBHANESEBHOR, S. E. & OTOBO, E. S., 1996. *In vitro* activity of human milk against the causative organisms of ophthalmia neonatorum in Benin City, Nigeria. *Journal of Tropical Pediatrics*, 42:327-329.
- LEAL, N. C.; CAVALCANTE, T. I. R.; SILVA, M. J. B.; REIS, E. M. F.; SOLARI, C. A. & HOFER, E., 1988. Frequency of enteropathogenic bacteria in children diarrhea cases from the city of Recife, Pernambuco, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:475-479.
- LEYVA, C. V.; VALDOS, A. E.; CISNEROS, D. E. & RIVERO, L. L., 1991. Biochemical characterization of fecal coliform strains isolated from food. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 5:118-121.
- MS (Ministério da Saúde), 1995. *Normas Gerais para Funcionamento de Bancos de Leite Humano*. Brasília: Secretaria de Programas Especiais, Ministério da Saúde.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1993. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 5th Ed. Villanova: NCCLS.
- NEU, H. C., 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257:1064-1073.
- RNBLH (Rede Nacional de Bancos de Leite Humano), 2000. *Manual Técnico*. 20 de Fevereiro de 2000 <<http://www.fiocruz.br/redeblh/manualtecnico/manualtecnicoframe.htm>>.
- RUBALTELLI, F. F.; BIADAIOLI, R.; PECILE, P. & NICOLETTI, P., 1998. Intestinal flora in breast and bottle-fed infants. *Journal of Perinatal Medicine*, 26: 186-191.
- SALLES, R. K. & GOULART, R., 1997. Diagnosis of hygienic-sanitary and microbiological conditions of hospital human milk banks. *Revista de Saúde Pública*, 31:131-139.
- SIMMONS, B. P.; GELFAND, M. S. & HAS, M., 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10:308-401.
- SPECK, L. M., 1984. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2th Ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- STEVENSON, D. K.; YANG, C.; KERNER Jr., J. A. & YEAGER, A. S., 1985. Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. *Clinical Pediatrics*, 24:338-341.
- VARNAM, A. H. & EVANS, M. G., 1991. *Food Borne Pathogens. An Illustrated Text*. London: Wolfe.
- YOSHIOKA, H.; ISEKI, K. & FUJITA, K., 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, 72:317-321.