



ARTIGO ORIGINAL

Contaminação do leite humano ordenhado por fungos miceliais*Contamination of expressed human milk by mycelial fungi*Franz Reis Novak¹, João Aprígio Guerra de Almeida², Manoel J.S. Santos³, Bodo Wanke⁴**Resumo**

Objetivo: caracterizar os gêneros de fungos miceliais encontrados em amostras de leite humano ordenhado, recebidas a partir de coleta domiciliar, pelo Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira.

Métodos: foram estudadas 821 amostras de leite humano ordenhado, obtidas ao acaso, a partir de frascos coletados nos domicílios pelas próprias doadoras. Foram realizadas pesquisas de bolores e leveduras e de microorganismos mesófilos. A partir das amostras de leite humano ordenhado, foram isoladas 48 cepas de fungos miceliais, que foram identificadas por técnicas-padrão de laboratório.

Resultados: as análises microbiológicas revelaram a ocorrência de bolores e leveduras em 43 (5,2%) das amostras, com contagens atingindo a ordem de 10^3 UFC/ml, e foram identificados os microorganismos *Aspergillus* Grupo Niger (6,3%), *Aspergillus sp.* (4,2%), *Paecilomyces sp.* (12,6%), *Penicillium sp.* (60,4%), *Rhizopus sp.* (2,0%) e *Syncephalastrum sp.* (14,5%). Quatro amostras apresentavam mais de um tipo de fungo micelial.

Conclusão: a presença de bolores e leveduras no leite humano ordenhado nos domicílios sugere que as condições higiênicas do local de coleta podem contaminar o leite. Portanto, quando se trata do repasse do produto cru para bebês prematuros hospitalizados, é fundamental observar as condições de coleta, estocagem e transporte para evitar a presença e as conseqüências da multiplicação de contaminantes.

J Pediatr (Rio J) 2002; 78 (3): 197-201: leite humano, bancos de leite, fungos miceliais, micotoxinas, aflatoxinas.

Abstract

Objective: to characterize the genera of mycelial fungi detected in expressed human milk received at the human milk bank of Instituto Fernandes Figueira after home collection.

Methods: we studied 821 expressed human milk samples randomly obtained from flasks filled by the donors at home. The possible presence of molds, yeasts and mesophilic microorganisms was investigated. A total of 48 strains of mycelial fungi were isolated from the human milk bank samples and identified through standard laboratory techniques.

Results: microbiological analysis revealed the occurrence of molds and yeasts in 43 samples (5.2%), with counts reaching 10^3 CFU/ml. The following microorganisms were identified: *Aspergillus niger* group (6.3%), *Aspergillus sp.* (4.2%), *Paecilomyces sp.* (12.6%), *Penicillium sp.* (60.4%), *Rhizopus sp.* (2.0%), and *Syncephalastrum sp.* (14.5%). Four samples showed the presence of more than one mycelial fungus type.

Conclusions: the presence of molds and yeasts in human milk manually expressed at home suggests that the hygiene conditions of the collection site may contaminate milk. Thus, when hospitalized premature babies receive the raw product, it is very important to observe the collection, storage and transport conditions in order to avoid the presence and consequences of contaminants increase.

J Pediatr (Rio J) 2002; 78 (3): 197-201: human milk, human milk bank, mycelial fungi, mycotoxins, aflatoxins.

1. Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor nos Cursos de Mestrado e Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança do Instituto Fernandes Figueira - IFF / Fundação Oswaldo Cruz. Membro da equipe do Banco de Leite Humano do IFF.
2. Doutor em Saúde Pública pelo Instituto Fernandes Figueira - IFF / Fundação Oswaldo Cruz. Professor nos Cursos de Mestrado e Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança do Instituto Fernandes Figueira. Chefe do Banco de Leite Humano do IFF.
3. Doutorando em Micologia. Laboratório de Micologia do Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz.
4. Doutor em Micologia. Chefe do Laboratório de Micologia do Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas. Fundação Oswaldo Cruz.

Artigo submetido em 01.11.01, aceito em 10.04.02.

Introdução

O banco de leite humano é um centro especializado responsável pela promoção do incentivo ao aleitamento materno e execução das atividades de coleta, processamento e controle de qualidade de colostro, leite de transição e leite maduro, para posterior distribuição, sob prescrição de médico ou de nutricionista, a crianças que dele necessitam como fator de sobrevivência¹.

O Brasil tem hoje a maior rede de bancos de leite humano do mundo. São 151 unidades, espalhadas em 22 estados, que beneficiaram, só no ano 2000, mais de 80.000 crianças prematuras e de baixo peso, tendo sido coletados mais de 90.000 litros de leite humano, com aproximadamente 60.000 doadoras cadastradas no território nacional².

Sob o ponto de vista tecnológico, o leite humano é um alimento não estruturado, pois não dispõe de nenhum tipo de barreira física que sirva de obstáculo à penetração de microorganismos contaminantes. Apesar de constituir-se no alimento ideal para os lactentes, uma vez que a sua composição apresenta todos os nutrientes em quantidade e qualidade necessários, o leite humano pode ser um excelente meio de cultura para toda sorte de microorganismos, uma vez esgotados seus fatores de proteção³. O leite materno obtido de doadoras sadias, submetidas a rigoroso controle de higiene, é livre de microorganismos patogênicos. Estes, quando ocorrem, encontram-se vinculados a fontes de contaminação externas³.

As evidências científicas comprovaram a eficácia e segurança da pasteurização do leite humano como processo de inativação de agentes patogênicos⁴⁻⁶. Porém, a ocorrência de fungos miceliais em leite humano ordenhado pode se tornar um problema, caso se destine a ser empregado *in natura*, quando se trata de leite da mãe para o próprio filho, como acontece nas UTIs neonatais.

Os fungos constituem um grupo diversificado de organismos que apresentam grande importância ecológica e econômica. Cerca de 70.000 espécies de fungos já foram descritas, entretanto, estima-se que o número total seja de aproximadamente 1,5 milhão⁷. Esses organismos são considerados de grande importância por várias razões: são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres, constituem importantes associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), constituem a avassaladora maioria dos patógenos de plantas, oferecem sistemas genéticos para os biólogos moleculares, e são cruciais para a biotecnologia industrial⁷.

Todavia, são indesejáveis nos alimentos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os mesmos, provocam sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando se multiplicam. Esses metabólitos recebem a denominação genérica de "micotoxinas" e, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais, que vão desde alergias até a carcinogênese⁸.

Como os bolores ocorrem em grande escala na natureza, a sua presença no leite humano ordenhado pode servir como indício de contaminação advinda do meio externo. A presença desse grupo de microorganismos no leite traz consigo, além do problema da deterioração, a possibilidade da produção de micotoxinas³.

A contagem de bolores e leveduras é usada como parte do critério microbiológico de alimentos lácteos em todo o mundo¹⁰. Como a literatura carece de informações sobre a

microbiota fúngica de interesse tecnológico para preservação do leite humano ordenhado, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os gêneros de fungos miceliais encontrados em amostras de leite humano ordenhado, visando contribuir para a redução dessa lacuna na literatura.

Métodos

O estudo emergiu das atividades de rotina do Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira – BLH/IFF e buscou descrever a ocorrência de fungos miceliais em 821 amostras individuais de leite humano ordenhado (LHO), provenientes de 20% das doadoras cadastradas no período. As amostras de conveniência foram obtidas de forma aleatória, dentre os frascos recebidos de cada doadora ao BLH do IFF, que se distribuíam por 262 localidades diferentes da cidade do Rio de Janeiro, no período de outubro de 1998 a janeiro de 2000.

As doadoras foram orientadas a observar o protocolo higiênico-sanitário, estabelecido pelo Ministério da Saúde, durante os procedimentos de ordenha¹¹. Uma vez ordenhado, o leite era acondicionado em frascos previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos e conservado sob congelamento entre -6°C e -10°C, por no máximo 5 dias, no congelador da geladeira ou no freezer da residência das doadoras e transportado em caixas isotérmicas, contendo termômetro, que registrava as temperaturas máxima e mínima.

No BLH-IFF, os frascos foram descongelados e alíquotas retiradas para análise de bolores e leveduras e de mesófilos. Como a coleta não foi acompanhada, informações como horários, períodos de lactação, e se o leite era de início ou de final da extração não foram considerados.

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de controle de alimentos do Instituto Fernandes Figueira, e a identificação das cepas de fungos miceliais foi realizada no laboratório de micologia do Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas-CPqHEC, ambos da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro – RJ.

As pesquisas de bolores e leveduras foram realizadas de acordo com o método descrito por Marvin (1976). Alíquotas de 1,0 ml do leite e de suas diluições decimais foram semeadas em duplicata, pela técnica de *pour plate*, em ágar dextrose batata (Merck). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 25°C por cinco dias. Foram contadas as colônias, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

As bactérias mesófilas foram pesquisadas de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*¹². Alíquotas de 1,0 ml do leite e de suas diluições decimais foram selecionadas e semeadas em duplicata, pela técnica de *pour-plate*, em ágar padrão (Merck). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Foram contadas as colônias, e os resultados expressos em UFC/ml. As

contagens de mesófilos foram realizadas por apresentarem relação direta com a população total de microorganismos presentes e que poderiam guardar uma certa proporcionalidade com a população de fungos miceliais, caso ambos tivessem a mesma fonte de contaminação¹².

O isolamento inicial dos fungos miceliais foi feito a partir das placas com crescimento de bolores e leveduras. Foram selecionadas colônias típicas de fungos miceliais e feitas sementeiras em ágar dextrose batata, incubando-se a 25°C por 3-5 dias. As culturas puras isoladas foram mantidas em tubos com o mesmo ágar inclinado, até o momento da identificação.

A identificação dos fungos miceliais foi realizada a partir das colônias obtidas no isolamento primário, que foram repicadas para ágar Sabouraud e mantidas em temperatura ambiente. Após a obtenção de crescimento, as colônias com no mínimo 10mm de diâmetro foram empregadas para o preparo de lâminas para microscopia direta, utilizando-se como corante o lactofenol de Aman e/ou azul de algodão, e como clarificante, NaOH a 10%. Desta forma, pôde-se observar as estruturas morfológicas dos fungos. Os fragmentos foram observados sob microscopia, e as morfologias comparadas com as descritas em publicação especializada¹³.

A análise estatística foi dividida em duas etapas, sendo a primeira o estudo da distribuição de frequência para se estudar o perfil sociocultural das doadoras, e a segunda, o teste de correlação entre as análises das contagens de fungos miceliais e mesófilos, empregando-se o *software System Analysis Statistical (SAS)* versão 6.11, do SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA.

Com relação aos aspectos éticos, o trabalho foi baseado nas diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (resolução CNS 196/96)¹⁴. Após sua avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira, deu-se início à obtenção das

amostras de leite humano ordenhado, que não ocasionou nenhuma alteração na rotina das doadoras do banco de leite do IFF, e as amostras foram utilizadas apenas para as contagens microbianas e para o isolamento das cepas de fungos miceliais.

Os dados referentes ao perfil sociocultural das doadoras foram obtidos diretamente do cadastro eletrônico do BLH-IFF, não havendo necessidade de consulta aos prontuários para coleta de dados adicionais, nem de contato entre os pesquisadores e as doadoras, de modo que elas nunca fossem identificadas. Considera-se, portanto, que as doadoras não foram submetidas a nenhum tipo de risco.

Resultados

Com relação ao perfil sociocultural das doadoras, observou-se que o grupo era composto por nutrízes pertencentes a diversas classes socioculturais, com idades variando entre 13 e 45 anos, das quais 2,1% apresentavam mais de 40 anos, e 13,7% tinham idades que variavam entre 13 e 19 anos. Ao considerar-se a escolaridade, observou-se que 334 (40,7%) doadoras possuíam primeiro grau, 254 (30,9%) segundo grau, e 233 (28,4%) terceiro grau.

Das 821 amostras de LHO analisadas, 43 (5,2%) apresentaram contaminação com 48 cepas de fungos miceliais. Três amostras apresentaram duas cepas, e uma amostra três cepas, com aspectos macroscópicos diferentes.

Como pode ser observado na Figura 1, os resultados revelaram a ocorrência de bolores e leveduras, com contagens atingindo a ordem de 10^3 UFC/ml, e dos seguintes microorganismos: *Aspergillus* Grupo *Niger* (6,3%), *Aspergillus sp.* (4,2%), *Paecilomyces sp.* (12,6%), *Penicillium sp.* (60,4%), *Rhizopus sp.* (2,0%) e *Syncephalastrum sp.* (14,5%).

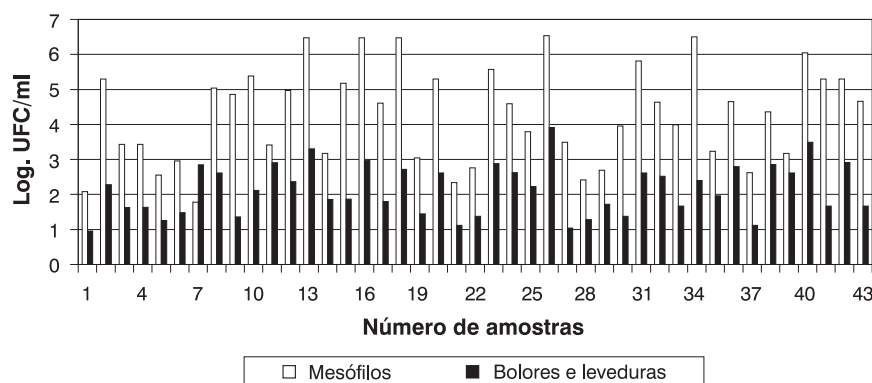


Figura 1 - Contagens de bolores e leveduras e de mesófilos encontrados nas amostras de leite humano

Ao estudar-se a correlação entre as contagens de bolores e leveduras com as populações totais representadas pelas contagens de mesófilos, o coeficiente de correlação (r) encontrado foi igual a 0,55, com limite de confiança 95%: $0,32 < R < 0,72$, não indicando uma forte correlação entre esses dois grupos.

Discussão

O leite humano ordenhado, mesmo sendo obtido de mulheres sadias, com todas as medidas de assepsia, pode apresentar contaminantes considerados normais. Entretanto, a presença de fungos miceliais de diferentes espécies sugere que as condições higiênico-sanitárias no momento da obtenção do leite não foram aquelas preconizadas.

Os resultados do presente estudo revelaram a presença de bolores e leveduras em apenas 5,2% das amostras, com contagens atingindo a ordem de 10^3 UFC/ml, o que sugere que as doadoras, na sua grande maioria, estão seguindo as recomendações de coleta e armazenamento do leite ordenhado.

É provável que os esporos de fungos existentes nos alimentos manipulados pelas doadoras sejam a fonte dos fungos encontrados no LHO, já que eles são muito semelhantes aos encontrados por outros pesquisadores em diferentes alimentos.

Em um estudo sobre a microbiota de manteigas vendidas no município de São Paulo, foi observado que em 94% das amostras foi detectada a presença dos seguintes fungos: *Cladosporium* em 18%, *Penicillium* em 12%, *Geotrichum* em 8%, *Aspergillus* em 6%, e *Trichoderma* em 6%¹⁵.

Alexandre et al. (1996) investigaram 71 amostras de frutas desidratadas comercializadas em Santiago do Chile e observaram que 45 (73,8%) apresentavam desenvolvimentos de fungos, dos quais *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Mucor* foram os mais encontrados.

Taniwaki et al. (1989), ao analisarem 3 variedades de maçãs produzidas no estado de São Paulo quanto à microbiota fúngica, isolaram *Cladosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria sp.*, *Phompsia sp.* e *Penicillium sp.*, além de outros bolores não identificados.

De 30 amostras de farinha de mandioca adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais de Niterói, estado do Rio de Janeiro, Kraemer et al. (1998) isolaram fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* (36,5%), *Penicillium* (18,2%), *Rhizopus* (10,5%), *Paecilomyces* (7,1%), *Mucor* (5,4%), *Neurospora* (3,1%), *Cladosporium* (2,3%), *Aureobasidium* (1,4%), *Syncephalastrum* (1,1%), *Metarrhizium* (0,8%), *Trichoderma* (0,3%), *Trichosporon* (0,3%) e *Humicola* (0,3%).

Ao examinarem microbiologicamente 2.533 amostras de leite de vaca procedentes de 32 propriedades de 18 municípios de São Paulo, Costa et al. (1986) revelaram a

presença de bolores e leveduras em 11,7% das amostras estudadas.

No presente estudo, as ordenhas foram conduzidas pelas próprias doadoras em suas residências, e pode-se imaginar que as condições higiênicas das doadoras ou do local de coleta também tenham concorrido para a presença de tais contaminantes, uma vez que não constitui motivo de dúvida a influência que o meio ambiente exerce sobre a qualidade do LHO, sendo essa influência amplamente discutida por Assis, já em 1981²⁰. No banco de leite humano do Instituto Materno-Infantil de Pernambuco, a análise de 1.143 amostras de LHO revelou uma melhor qualidade microbiológica do leite coletado no BLH em relação ao coletado no alojamento conjunto e no domicílio das doadoras²¹.

Almeida, em 1986³, observou a ocorrência de bolores e leveduras em 69,4% das amostras de LHO coletadas no Instituto Fernandes Figueira, com contagens atingindo a ordem de 10^6 UFC/ml. Foram efetuadas modificações na técnica de coleta e as contagens foram repetidas, revelando redução na incidência desses microorganismos para 16,7% das amostras e contagens inferiores a $3,0 \times 10^2$ UFC/ml.

A ocorrência de fungos no LHO pode ter relação direta com hábitos culturais, mostrando que o simples ato de lavar as mãos de forma adequada ainda não é completamente difundido em nosso meio²².

A maioria das infecções cutâneas causadas por fungos está relacionada com os dermatófitos, que incluem diferentes espécies dos gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, que causam várias manifestações clínicas, conhecidas como dermatofitoses ou tíneas²³. Fungos desses gêneros não foram encontrados no presente estudo.

Os dados obtidos demonstram a importância do controle da assepsia das mãos das doadoras que estejam manipulando alimentos imediatamente antes da coleta do LHO, uma vez que os esporos dos fungos contidos nos alimentos podem ser transferidos das mãos das doadoras para o LHO. Tal afirmativa se baseia no fato de que os fungos identificados no presente trabalho são compatíveis com aqueles encontrados em diversos alimentos.

Apesar dos protocolos distribuídos pelos BLHs orientarem e instruírem as doadoras, não pode ser esquecido o valor da orientação dada pelos profissionais num relacionamento de presença face-a-face, lembrando e demonstrando pequenos detalhes, que são cruciais para o sucesso da coleta do LHO.

Se for considerado que o LHO será pasteurizado e que os fungos miceliais, sensíveis a este procedimento, desaparecerão, o problema estaria terminado, mas, quando se trata do repasse do produto *in natura* para bebês prematuros hospitalizados, torna-se fundamental observar as condições de coleta, estocagem e transporte para que se possa evitar a presença e as conseqüências da multiplicação de tais contaminantes no LHO.

Referências bibliográficas

1. Almeida JAG. Amamentação: um híbrido natureza cultura. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1999.
2. Ministério da Saúde. Informe Saúde. Ano 4. Nº 69. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.
3. Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1986.
4. Wright KC, Feeney AM. The bacteriological screening of donated human milk: laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. *J Infect* 1998; 36:23-7.
5. Lepri L, Del Bubba M, Maggini R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B Biomed Sci* 1997; 704:1-10.
6. Baum JD. Donor breast milk. *Acta Paediatr Scand* 1982; 299(Suppl): 51-7.
7. Li S, Marquardt RR, Abramson D. Immunochemical detection of molds: a review. *J Food Prot* 2000; 63:281-91.
8. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 1997; 28:279-83.
9. Baldissera MA, Santurio JM, Canto SH, Pranke PH, Almeida CAA, Schimidt C. Aflatoxin, ochratoxin A and zearalenone in animal feedstuffs in south Brazil. Part II. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1993; 53:5-10.
10. ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. New York: Academic Press; 1978.
11. Ministério da Saúde. Normas gerais para bancos de leite humano. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1998.
12. Marvin LS. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association; 1976.
13. Figueiras MJ, Gené J. Atlas of Clinical Fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherlands/Spain: Universitat Rovira i Virgili/Reus; 1995.
14. Ministério da Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humano – Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998.
15. Paula CR, Gambale W, Iaria ST, Reis Filho SA. Ocorrência de fungos em manteigas oferecidas ao consumo público no Município de São Paulo. *Rev Microbiol* 1988;19:317-20.
16. Alexandre SM, Ibáñez HV, Thompson ML. Hongos filamentosos contaminantes de superfície de diferentes frutas desidratadas de venta libre en Santiago de Chile. *Rev Chil Infectol* 1996; 13:210-5.
17. Taniwaki MH, Bleinroth EW, De Martin ZJ. Patulin producing moulds in apple and industrialized juice. *Colet Inst Tecnol Alimentos* 1989;19:42-9.
18. Kraemer FB, Stussi JSP. Evaluation of samples of manioc flour (*Manihot utilissima*). *Hig Aliment* 1998; 12:38-40.
19. Costa EO, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira CM, Gambale W, Gandra CRP, et al. Bacterial etiology of bovine mastitis in the State of São Paulo. *Rev Microbiol* 1986;17:107-12.
20. Assis MAA. Estudos sobre a preservação de colostro humano para Bancos de Leite [dissertação]. Campinas: UNICAMP; 1981.
21. Serva VB, Albuquerque MRG, Rolim EG. Evaluation of microbiologic quality of the human milk from human milk bank. *Revista do IMIP* 1991;5:30-3.
22. Novak FR. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em leite humano ordenhado [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.
23. Lima EO, Chaves LM, Oliveira NMC. Isolation of dermatophytes of tineas in the region of João Pessoa beaches. *Ciencia, Cultura e Saude* 1994;13:55-8.

Endereço para correspondência:

Dr . Franz Reis Novak
Banco de Leite Humano - Instituto Fernandes Figueira
Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo
CEP 22250-020 – Rio de Janeiro, RJ
Fone/Fax: (21) 5535669
E-mail: novak@iff.fiocruz.br