

## RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM COLIFORMES TOTAIS ISOLADOS DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE LEITE BOVINO

Amanda Keller Siqueira<sup>1\*</sup>, Taila dos Santos Alves<sup>1</sup>, Mirtis Maria Giaciani Ferraz<sup>1</sup>, Marília Masello Junqueira Franco<sup>2</sup>, Rodrigo Garcia Motta<sup>2</sup>, Fernando José Paganini Listoni<sup>2</sup>, Aristeu Vieira da Silva<sup>3</sup>, Márcio Garcia Ribeiro<sup>2</sup>, Domingos da Silva Leite<sup>1</sup>

**RESUMO** - O leite adequado ao consumo deve possuir qualidade higiênica, valor nutritivo e a manutenção das propriedades organolépticas. O isolamento de coliformes totais e/ou fecais de leite bovino é considerado um indicador de sanidade e de boas práticas de manejo, podendo ser usado como indicador de qualidade. Este estudo teve como objetivo isolar, identificar e observar o perfil de resistência de coliformes presentes em tanques de refrigeração coletivos e individuais de acondicionamento de leite. Foram colhidas 89 amostras de leite de tanques coletivos e isolados 21 *Klebsiella* spp., uma *Escherichia coli* (*E. coli*) e 29 *Enterobacter* spp., e 102 amostras de leite de tanques individuais das quais foram isolados uma *Klebsiella* spp. e sete *Enterobacter* spp. Dos tanques coletivos, aproximadamente 47% de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. foram resistentes para cefalexina e 30% para ampicilina. Destes, no mínimo 24% apresentaram multirresistência. Entre os isolados de tanques individuais, 85% ou mais apresentaram resistência para ampicilina. O fenótipo ESBL e o gene *bla*<sub>TEM</sub> foram detectados em linhagens de *Klebsiella* spp. isoladas de ambos os tanques. Constatou-se contaminação do leite com coliformes totais resistentes e, principalmente, que o armazenamento do leite cru de vários pequenos produtores em tanques coletivos potencializa o risco de contaminação.

Palavras-chave: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., multirresistência, vacas de leite

## ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN TOTAL COLIFORMS ISOLATED FROM BULK TANK MILK

**ABSTRACT** – Milk that is adequate for consumption must be of hygienic quality, nutritional value, and should maintain its organoleptic properties. Isolation of fecal and/or total coliforms from bovine milk is considered an indicator of hygiene and good management practices, and can be used as a quality indicator. This study aimed to isolate, identify, and assess the resistance profile of coliforms isolated from collective bulk tanks and individual milk tanks. A total of 89 milk samples were collected from collective bulk tanks and, from these, 21 *Klebsiella* spp., one *E. coli*, and 29 *Enterobacter* spp. were isolated, whereas 102 milk samples from individual tanks showed isolation of one *Klebsiella* spp. and seven *Enterobacter* spp. In collective bulk tanks, at least 47% of *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. were resistant to cephalexin and 30% to ampicillin. From these, at least 24% showed multidrug resistance. Among the microorganisms isolated from the individual tanks, 85% or more were resistant to ampicillin. The ESBL phenotype and the *bla*<sub>TEM</sub> gene were detected in strains of *Klebsiella* spp. isolated from both tanks. It was concluded that contamination of milk with resistant total coliforms, and especially the storage of raw milk from several small producers in the collective bulk tank increase the risk of contamination.

Keywords: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., multiresistance, dairy cow

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas, End.: R. Domingos Jorge Velho, 25, Votorantin (Rod. Bunjiro Nakao, km60) Ibiúna, SP Cep 18150000, kellersiqueira@hotmail.com \*Autor para correspondência; <sup>2</sup>Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP/Botucatu, SP; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, 44036-900, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O leite de qualidade deve possuir três atributos: qualidade higiênica, valor nutritivo e manutenção das propriedades organolépticas. A saúde e o manejo do rebanho são fundamentais para a qualidade do leite produzido, nos quais os procedimentos higiênicos adotados na produção e no armazenamento do leite nas propriedades rurais são pontos cruciais (Brito 2008).

O isolamento de coliformes totais e/ou fecais de leite bovino é considerado um indicador de sanidade e boas práticas de manejo e pode ser usado como indicador de qualidade. O leite de tanques de refrigeração tem sido usado para diagnosticar vários problemas relacionados com a qualidade que podem existir em rebanhos leiteiros. A presença de coliformes em tanques é sugestiva de deficiências de manejo na ordenha (Silva et al. 2010).

Os coliformes totais fazem parte de um grupo de bactérias composto por membros da família Enterobacteriaceae capazes de fermentar a lactose e produzir gás entre 35 e 37°C, gram-negativos e não formadores de esporos. *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* fazem parte deste grupo. *E. coli* tem como hábitat o trato gastrintestinal de humanos e animais. Os outros membros do grupo podem ser encontrados em fezes, porém são mais frequentemente isolados do ambiente. Assim, a presença de coliformes totais no alimento pode não indicar contaminação fecal (Franco; Landgraf 2008).

As bactérias psicotróficas, incluindo Enterobacteriaceae, são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C. O grupo de microrganismos psicotróficos inclui bactérias gram-negativas (como os coliformes) e gram-positivas. A própria estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção reduz perdas econômicas por atividade acidificante de bactérias mesófilas, mas permite a seleção de bactérias psicotróficas relacionadas a problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios (Fonseca; Santos 2001).

A infecção por enterobactérias ocorre pelo canal do teto em qualquer fase da vida dos animais, incluindo na ordenha, período entre ordenhas e período seco (Radostits et al. 2007). *E. coli*, *Klebsiella* spp., seguidos por *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp. são os patógenos gram-negativos mais frequentemente isolados de casos de mastite clínica em bovinos leiteiros (Locatelli et al. 2010).

*E. coli* é considerado um dos principais indicadores de contaminação de alimentos e da água. O microrganismo está associado a infecções entéricas e extra–entéricas em humanos e animais. A mastite por *E. coli*, em vacas, ocorre via ascendente pelo canal do teto, por contaminação no ambiente da pré e pós–ordenha, de utensílios de manejo da ordenha (insufladores) ou água utilizada nos procedimentos de limpeza de úbere ou da ordenhadeira mecânica (Philpot; Nickerson 2002).

A infecção da glândula mamária por *K. pneumoniae* tem sido associada com a contaminação do ambiente dos animais (Wenz et al. 2001, Sapimon et al. 2006), principalmente com o contato das vacas, no período entre ordenhas, com material orgânico e fezes (Munoz et al. 2006). O

microrganismo permanece no ambiente das granjas leiteiras por todo tempo, visto que é considerado habitante normal do intestino dos bovinos (Munoz et al. 2008).

As espécies de *Enterobacter* são mundialmente distribuídas na natureza e são encontradas em grande diversidade de ambientes como solo, água, indústrias alimentícias, vegetação, além de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Estas bactérias também são reconhecidas como patógenos humanos (Cooney et al. 2011). Assim como *Klebsiella* spp. possuem grande capacidade de contaminarem equipamentos médicos e soluções para uso parenteral. Diversas espécies de *Enterobacter* têm sido isoladas do solo, de moscas, grãos, bebidas fermentadas e até mesmo leite UHT (Martinez; Trabulsi 2008).

A mastite é a enfermidade mais onerosa para a produção de leite (Quinn et al. 2011). Esta afecção gera impacto negativo na produção animal, no bem-estar animal e na qualidade do leite produzido (Hillerton; Berry 2005, Holanda Júnior et al. 2005). Além de acarretar grandes perdas econômicas pode tornar o leite um veículo de microrganismos patogênicos resistentes, inclusive para antimicrobianos utilizados em medicina humana, podendo gerar graves problemas de saúde pública, sendo considerada razão primária para o uso de antimicrobianos em rebanhos bovinos produtores de leite (Pol; Ruegg 2007, Burgos et al. 2005).

A década de 1940 marcou o aparecimento de resistência bacteriana para a penicilina (Dzidic; Bedekovic 2003, Livermore; Pearson 2007). Desde então, os mecanismos de resistência são objeto de estudo e motivo de preocupação para profissionais da saúde.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), por definição, são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de 3ª geração) e monobactam e, são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e/ou tazobactam. A primeira ESBL foi observada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha na década de 80. A partir de então, muitas ESBLs foram encontradas por todo o mundo em diversas espécies bacterianas (Shah et al. 2004, Perez et al. 2007, Wilberger et al. 2012).

A emergência e o aumento da resistência aos antimicrobianos no Brasil e no mundo apontam para a necessidade de estudos continuados do perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de humanos e animais. Este estudo teve como objetivo isolar, identificar e observar o perfil de resistência de coliformes de tanques coletivos e individuais, da região sudeste do estado de São Paulo, Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas 89 amostras de leite de tanques de expansão coletivos (cerca de cinco propriedades por tanque) e 102 amostras de tanques individuais (uma propriedade por tanque). Estas foram colhidas no momento do preparo para o transporte aos laticínios, assim sendo, não foram averiguadas informações do manejo individual dos animais em lactação nestas propriedades.

As amostras de leite bovino de tanques de expansão coletivos e individuais foram obtidas na bacia leiteira da região sudeste do estado de São Paulo. As propriedades que possuíam tanques coletivos apresentavam ordenha manual e produção diária entre 12 e 125 litros, com média de 43

litros por dia. Já as propriedades que possuíam tanques de expansão individuais apresentavam ordenha mecanizada e produção diária entre 120 e 3000 litros de leite, com média de 280 litros por dia.

Os microrganismos foram isolados a partir do cultivo do leite em placas de ágar Mac Conkey com o intuito de selecionar enterobactérias. Posteriormente, colônias foram inoculadas no conjunto de meios EPM/MiLi/Citrato, recomendado pela ANVISA (2004), para a identificação de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp..

Os coliformes isolados foram submetidos ao método “in vitro” de difusão com discos para caracterizar o perfil de sensibilidade fenotípico aos antimicrobianos de acordo com os parâmetros do “Clinical and Laboratory Standards Institute” - CLSI (2008, 2012). Foram utilizados discos de antimicrobianos amplamente empregados na rotina clínica da medicina veterinária e humana. A saber: amikacina (30µg), amoxicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30µg), ampicilina (10µg), aztreonam (30µg), cefalexina (30µg), cefepima (30µg), cefoperazona sódica (75µg), ceftiofina (10µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), levofloxacina (5µg), sulfametoxazole/trimetoprim (25µg) e tetraciclina (30µg) (Ribeiro 2008, Winn Jr. et al. 2008).

As cepas de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. resistentes para antimicrobianos β-lactâmicos foram então submetidas ao teste de disco aproximação para a detecção fenotípica da produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) utilizando aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg), cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg), dispostos a uma distância de 20 mm do disco de amoxicilina/ácido clavulânico (30µg). Após incubação a 37° C por 24 horas, as placas foram lidas de acordo com as recomendações do CLSI (2005). A presença de “zona fantasma”, em decorrência do alargamento do halo de inibição dos antimicrobianos, indicou fenótipo ESBL positivo.

O ácido nucléico total foi extraído a partir dos isolados bacterianos inoculados individualmente em BHI e incubados a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi aliquoteado e congelado a -20°C.

Para a reação de PCR foram utilizados iniciadores específicos para determinar genes codificadores de resistência para β-lactâmicos nas cepas que apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos β-lactâmicos (Tabela 1). De acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório de Antígenos Bacterianos, do Instituto de Biologia, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para cada reação foram utilizados 1,5 U *Taq* polimerase, 3µL de Tampão 10X para PCR, 400µM de dNTP, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 7µL de DNA e quantidades ótimas de cada iniciador.

Os resultados das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose preparados em concentração 1,5% em TAE 1 X, corados com SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (10.000X em DMSO) 1% e visualizadas em transiluminador de luz UV. Como marcadores de peso molecular foram utilizados: Ladder 50 pb, Ladder 100 pb e Ladder 1 kb.

**Tabela 1.** Primers para a determinação da presença de genes de grupos de  $\beta$ -lactamases em coliformes isolados de leite bovino de tanques de expansão coletivos e individuais obtidos na bacia leiteira da região sudeste do estado de São Paulo

Gene	Sequências (5'- 3')	T°C/Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TCG GGG AAA TGT CGC G TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	60 / 972	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	TTA TCT CCC TGT TTA GCC ACC GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG	61 / 795	Cao et al. 2002
<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	TTA GGC CTC GCC GAA GCG CTT TGT TTT AGC CAC CAA TGA TG	55 / 988	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	55 / 593	Boyd et al. 2004
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	TGT CAC TGT ATC GCC GTC CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC	58 / 1.000	Yigit et al. 2001
<i>ampC</i>	CCC CGC TTA TAG AGC AAC AA TCA ATG GTC GAC TTC ACA CC	60 / 634	Féria et al. 2002

\*T °C: temperatura de anelamento; pb: tamanho do produto de PCR em pares de bases.

## RESULTADOS

Das 89 amostras de leite provenientes de tanques coletivos foram isolados 21 *Klebsiella* spp., uma *E. coli* e 29 *Enterobacter* spp.

A resistência em *Klebsiella* spp. isoladas de leite de tanques coletivos foi diagnosticada fenotipicamente em 81% (17/21) dos isolados para amoxicilina, 47,6% (10/21) para cefalexina, 30% (7/21) para ampicilina, cefoxitina e sulfametoxazole associado ao trimetoprim, 9,5% (2/21) para ceftiofur e 4,8% (1/21) para aztreonam, cefoperazona, cloranfenicol, enrofloxacin e tetraciclina. O fenótipo ESBL foi observado (Figura 1) em uma cepa de *Klebsiella* spp. que também amplificou o gene *bla*<sub>TEM</sub>. A multirresistência para o mínimo de duas classes de antimicrobianos foi observada em 47,6% (10/21) dos isolados. Na análise genotípica realizada pela PCR foi detectado o gene *bla*<sub>TEM</sub> em 23,8% (5/21) dos isolados de *Klebsiella* spp. (Tabela 2).

A única cepa de *E. coli* isolada de tanque coletivo foi 100% sensível a todos os antimicrobianos testados, embora tenha apresentado o gene *bla*<sub>TEM</sub> (Tabela 2).

Dos 29 *Enterobacter* spp. isolados de tanques coletivos 63% (18/29) foram resistentes para cefalexina, 51,7% (15/29) para ampicilina, 27,6% (8/29) para tetraciclina, 10,3% (3/29) para cloranfenicol, 6,9% (2/29) para sulfametoxazole associado ao trimetoprim e 3,5% (1/29) para ceftiofur. Multirresistência para duas ou mais classes de antimicrobianos foi observada em 24,2% (7/29) das cepas. O fenótipo ESBL não foi observado, tampouco foram encontrados genes codificadores da produção de  $\beta$ -lactamases (Tabela 2).

Das 102 amostras de leite de tanques individuais foram isolados uma *Klebsiella* spp. e sete *Enterobacter* spp. (Tabela 2).

A única cepa de *Klebsiella* spp. apresentou resistência fenotípica para amoxicilina e também o fenótipo ESBL. A PCR revelou a presença dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *ampC* (Tabela 2).

Entre as sete cepas de *Enterobacter* spp. isoladas de tanques individuais, a resistência antimicrobiana pôde ser observada em 85,7% (6/7) para ampicilina e em 42,9% (3/7) para cefalexina. Multirresistência e o fenótipo ESBL não foram observados, bem como nenhum gene de resistência (Tabela 2).

Os outros genes pesquisados não foram encontrados em nenhuma das bactérias analisadas.

**Tabela 2.** Resistência e multirresistência aos antimicrobianos, fenótipo ESBL e presença de genes codificadores da produção de  $\beta$ -lactamases em coliformes isolados de leite bovino de tanques de expansão coletivos e individuais obtidos na bacia leiteira da região sudeste do estado de São Paulo

	<i>Klebsiella</i> spp.		<i>E. coli</i>		<i>Enterobacter</i> spp.	
	TC (n=21)	TI (n=1)	TC (n=1)	TI <sup>1</sup>	TC (n=29)	TI (n=7)
Antimicrobianos <sup>2</sup>						
Amoxicilina	81%	100%	0	-	NT	NT
Ampicilina	30%	0	0	-	51,7%	85,7%
Aztreonam	4,8%	0	0	-	NT	NT
Cefalexina	47,6%	0	0	-	63%	42,9%
Cefoperazona	4,8%	0	0	-	0	0
Cefoxitina	30%	0	0	-	NT	NT
Ceftiofur	9,5%	0	0	-	3,5%	0
Cloranfenicol	4,8%	0	0	-	10,3%	0
Enrofloxacina	4,8%	0	0	-	0	0
Sulfametoxazole/Trimetoprim	30%	0	0	-	6,9%	0
Tetraciclina	4,8%	0	0	-	27,6%	0
Multirresistência <sup>3</sup>	47,6%	0	0	-	24,2%	0
Fenótipo ESBL	4,8%		0	-	0	0
Genes de resistência <sup>4</sup>						
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	23,8%	100%	100%	-	0	0
<i>ampC</i>	0	100%	0	-	0	0

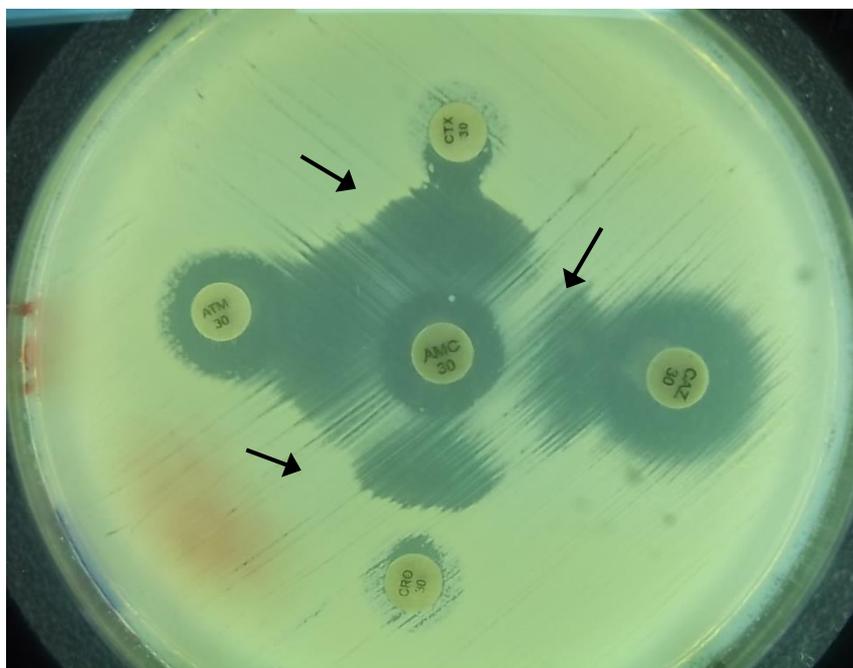
\*TC: tanque de expansão coletivo; TI: tanque de expansão individual; NT: não testado.

<sup>1</sup> Não houve isolamento de *E. coli* em tanques de expansão individuais.

<sup>2</sup> Porcentagens de isolados resistentes aos antimicrobianos testados.

<sup>3</sup> Multirresistência para o mínimo de duas classes de antimicrobianos.

<sup>4</sup> Porcentagem de isolados positivos para a pesquisa de genes de grupos de  $\beta$ -lactamases.



**Figura 1.** Fenótipo ESBL-positivo no teste de disco aproximação em linhagem de *Klebsiella* spp. isolada de leite bovino proveniente de tanque de expansão individual. As setas indicam a presença de “zona fantasma” característica das cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases

## DISCUSSÃO

A qualidade do leite permanece como tópico de intenso debate na indústria de laticínios e entre as comunidades de profissionais das áreas médicas e de saúde pública. A produção máxima de leite com alta qualidade é um objetivo fundamental de toda cadeia leiteira (Oliver et al. 2009). O leite de qualidade deve possuir gosto agradável, ser mais nutritivo e ter longa vida de prateleira. Já o leite de baixa qualidade afeta todos os segmentos da indústria do leite, resultando no decréscimo das propriedades fabris e em produto final com vida de prateleira reduzida (Oliver; Murinda 2012).

A ausência de patógenos causadores de infecções de origem alimentar é um dos principais quesitos de qualidade. Muitos patógenos habitam órgãos e sistemas dos animais de produção, principalmente pele e trato gastrointestinal, além do ambiente da propriedade. Estes microrganismos podem contaminar a carne e o leite durante a estabulação dos animais e na ordenha, ou até mesmo contaminar vegetais quando o solo é fertilizado com matéria orgânica de origem animal (Oliver et al. 2009).

O leite cru é reconhecido há décadas como veículo de transmissão de grande variedade de patógenos. Entre 1993 e 2006, 68 surtos de doenças associadas com o consumo de leite não pasteurizado e subprodutos foram reportados nos EUA. Em anos recentes, *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* são os quatro gêneros bacterianos mais frequentemente associados com surtos de doenças de origem alimentar. Todos os surtos reportados entre 2000 e 2008, nos Estados Unidos da América, de acordo com as evidências epidemiológicas, foram causados pelo consumo de leite cru ou seus subprodutos (Oliver et al. 2009).

É considerada de importância primária a necessidade de providenciar programas de educação e material que traga informações sobre os riscos microbianos à saúde para fazendeiros,

trabalhadores das fazendas de leite e de laticínios e consumidores. Os produtores devem estar bem informados quanto aos riscos que o produto que comercializam pode oferecer. O aprimoramento de programas educacionais voltados para consumidores é essencial para protegê-los de riscos potenciais associados com o consumo de leite cru (Oliver et al. 2009).

Em uma perspectiva de saúde pública há potencial de disseminação de bactérias patogênicas e comensais resistentes aos antimicrobianos, de animais para seres humanos, via contato direto ou pela cadeia alimentar. Nos sistemas de produção de bovinos há intensa pressão de seleção para microrganismos resistentes devido ao uso de antimicrobianos no tratamento de diversas infecções (mastite, laminite, doenças respiratórias), na profilaxia (terapia da vaca seca) e como promotores de crescimento (alimentação de suínos e aves). Estas práticas podem promover a resistência aos antimicrobianos de duas formas: 1) permitem que a população de bactérias resistentes expanda em números por seleção competitiva das cepas em detrimento das não resistentes, 2) também por permitir a disseminação de genes de resistência entre novos hospedeiros bacterianos quando estes estão albergados em elementos móveis como plasmídios e transposons (Call et al. 2008). A transmissão por alimentos pode ser a principal rota para a aquisição humana de bactérias entéricas resistentes ou com potencial para transmitir genes de resistência (Vieira et al. 2011).

No que tange as medidas adotadas, nas propriedades amostradas, visando à ordenha higiênica e controle da mastite, somente 15% dos criatórios com tanques de expansão individuais realizavam pré-dipping, secagem dos tetos, pós-dipping e a terapia da vaca seca. Em contraste, nenhum produtor com tanque coletivo realizava estas medidas de controle e profilaxia para infecções mamárias. Estes resultados indicam a existência de falhas de manejo no controle e profilaxia da mastite nas propriedades estudadas, assim como na realização de boas práticas de produção visando à higiene de ordenha e a qualidade do leite. A adoção de procedimentos como pré e pós-dipping, terapia da vaca seca, descarte de vacas com mastite crônica, treinamento de trabalhadores para ordenha higiênica, manutenção dos equipamentos de ordenha e realização sistemática de testes como a prova do Tamis, “California Mastitis Test” (CMT) e cultivo microbiano de quartos positivos, podem contribuir significativamente no controle e profilaxia da mastite, e na melhoria da qualidade do leite nos criatórios amostrados (Fonseca; Santos 2001).

Entre os produtores amostrados, 42% com tanques de expansão individuais e 62% com tanques coletivos afirmaram não receber nenhum tipo de assistência veterinária regular. Nestas propriedades, o contato com o médico veterinário restringe-se a atendimentos isolados de casos clínicos emergenciais. Estes dados são preocupantes, visto que elevado número de produtores da região não dispõem de orientação técnica e assistência veterinária na elaboração de programas destinados ao manejo sanitário do rebanho, tampouco no controle e profilaxia de doenças, particularmente a mastite, impactando negativamente na qualidade e no volume de produção de leite.

A caracterização dos microrganismos nos tanques de expansão é considerada procedimento importante nos programas direcionados à melhoria da qualidade do leite, posto que permite nortear a provável origem de contaminação do leite. A diferenciação dos agentes em

contagiosos e ambientais possibilita inferir, estrategicamente, quais medidas de controle e profilaxia poderão ser adotadas em cada criatório. A contaminação do leite geralmente é causada por deficiências nos processos de higienização do ambiente, dos equipamentos e utensílios de ordenha ou problemas relacionados ao armazenamento inadequado do produto final, por falhas de resfriamento do leite até a coleta a granel pelo laticínio (Santos 2003, Ribeiro 2008).

Existem benefícios do uso de antimicrobianos: 1) vacas saudáveis são mais produtivas; 2) baixa incidência de doenças; 3) redução de morbimortalidade; 4) redução da carga de patógenos; 5) produção abundante de leite nutritivo e de alta qualidade. Em contraste, o uso de antimicrobianos na agricultura pode ter parte da responsabilidade na emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos, podendo afetar o tratamento de doenças na população humana. Ademais, o leite de vacas tratadas para a mastite é associado com alta ocorrência de resíduos. Esse leite não é apenas um problema para a saúde pública e segurança alimentar, mas também importante fator econômico para o produtor que pode ser penalizado pelo leite alterado, além de colocar em risco o produto e subprodutos (Oliver; Murinda 2012).

As evidências científicas não conseguem dar suporte a informação de que a emergência e disseminação de resistência bacteriana sejam diretamente relacionadas ao uso de antimicrobianos em animais de produção. No entanto, o uso indiscriminado pode contribuir para o aparecimento e aumento da resistência microbiana (Oliver; Murinda 2012).

As bactérias produtoras de ESBL representam um dos mais importantes problemas de resistência bacteriana nos hospitais brasileiros. *K. pneumoniae* é isolado em aproximadamente 29,0% das infecções hospitalares e, geralmente, estas infecções estão associadas com alta morbimortalidade (Pereira et al. 2003). A difusão destas enzimas pelo mundo é atribuída por sua mobilidade (Sacha et al. 2009), podendo assim ter seus genes transferidos para outras bactérias da mesma espécie ou até de espécies distintas (Shah et al. 2004, Perez et al. 2007).

*E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases têm sido isoladas de animais e de alimentos de origem animal (Carattoli 2001). Nam et al. (2010), ao isolar bactérias gram-negativas de leite cru de rebanhos provenientes da Coreia, encontraram 78,2% de resistência para ampicilina, 46,5% para tetraciclina e 21,8% para gentamicina. Mais recentemente, a frequência de *Enterobacter* resistente para as cefalosporinas de terceira geração tem aumentado no mundo todo (Wilberger et al. 2012).

A presente pesquisa revelou a presença de genes de resistência para  $\beta$ -lactâmicos, bem como o fenótipo ESBL de Enterobacteriaceae isoladas de leite bovino avaliado, indicando que o uso excessivo ou não racional pode ser um dos principais fatores para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

A evolução do impacto da resistência em bactérias isoladas de animais na saúde humana não deve ser limitada as bactérias patogênicas, mas devem incluir comensais, considerados também fontes de genes de resistência (Smet et al. 2010).

De maneira similar ao observado por Ribeiro (2001), Villa (2007) e Brito (2008), o presente estudo descreve alta prevalência de enterobactérias em tanques de expansão. Estes achados são indicativos de falhas na higiene do ambiente da pré e pós ordenha e no momento da ordenha, particularmente nos procedimentos de limpeza e desinfecção dos tetos dos animais, deficiência na

higienização das ordenhadeiras, das mãos dos ordenhadores, tanques e utensílios de armazenamento e transporte do leite. Sinalizam também deficiências na profilaxia de agentes ambientais de mastite, o que nos leva a considerar de forma preocupante sobre o risco para a saúde pública a partir da ingestão do leite cru.

Pinto et al. (2006) descreveram que a maior contaminação do leite dos tanques coletivos da Zona da Mata Mineira pode ser consequência da mistura do leite cru de diferentes propriedades e graus de contaminação, além de, no transporte e estocagem para os laticínios, poder ocorrer novas contaminações e o aumento do número de microrganismos. Citadin et al. (2009), no estado do Paraná, relataram elevadas concentrações de microrganismos no leite cru refrigerado e apontaram para a necessidade de investimentos nas propriedades e no treinamento dos profissionais em boas práticas de manejo da ordenha.

Em todo mundo é crescente a preocupação com a obtenção de Produtos de Origem Animal (POA) que atendam às exigências do mercado, cada vez mais competitivo (Winn Jr. et al. 2008). A qualidade do leite deve ser interpretada com cautela, pois o termo apresenta concepções variadas e significados distintos para muitos gestores. No entanto, a compreensão da qualidade é fator indispensável para a tomada de decisões que nortearão os programas de melhoria da qualidade (Souza et al. 2008). A garantia da qualidade no processo produtivo, ainda na produção primária, é fundamental, pois a ausência de conformidade nessa etapa compromete de forma irreversível a qualidade do produto final.

## CONCLUSÕES

Constatou-se contaminação do leite com coliformes totais resistentes e, principalmente, que a granelização do leite cru de vários pequenos produtores em tanques coletivos de refrigeração potencializa o risco de contaminação do produto “in natura”.

## AGRADECIMENTOS

Bolsa de Pós-doutorado FAPESP (2011/17957-0); Auxílio à Pesquisa FAPESP (2012/03128-5); Bolsa PIBIC CNPq (129037/2013-3).

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Módulo V. 2004.

Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-Kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase involved in outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:3758-64.

Brito MAVP. Segurança e Qualidade do Leite. [Internet]. [acesso em 2008 jan 03]. Disponível em: [www.cnpqgl.embrapa.br/pesquisa/seguranca.pdf](http://www.cnpqgl.embrapa.br/pesquisa/seguranca.pdf)

- Burgos JM, Ellington BA, Varela MF. Presence of multidrug resistant enteric bacteria in dairy farm topsoil. *J Dairy Sci.* 2005; 88:1391-1398.
- Call DR, Davis MA, Sawant AA. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim Health Res Rev.* 2008; 9:159-167.
- Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. Distribution of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3739-3743.
- Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 2001; 32:243-259.
- Citadin AS, Pozza MSS, Pozza PC, Nunes RV, Borsatti L, Mangoni J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. *Rev Bras Saúde Prod An.* 2009; 10:52-59.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - approved standard. Document M7-A9. 9. ed. Wayne (PA). 2012.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from Animals - approved standard. Document M31-A3. 3. ed. Wayne (PA). 2008.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – approved standard. Document M100-S15. 15<sup>a</sup> Inform Suppl. Wayne (PA). 2005.
- Cooney S, Iversen C, Healy B, O'Brien S, Fanning S. *Enterobacter* spp. *Encyclopedia of Dairy Sci.* 2. ed. Boston: Elsevier; 2011.
- Dzidic S, Bedekovic V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24:519-26.
- Féria C, Ferreira E, Correia JD, Gonçalves J, Caniça M. Patterns and mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J. Antimicrob Chemother.* 2002; 49:77-85.
- Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. 175p.
- Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. 182p.
- Hillerton JE, Berry EA. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *J. Appl Microbiol.* 2005; 98:1250-1255.

- Holanda Júnior EV, Madalena FE, Holanda ED, Miranda WM, Souza MR. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – MG, Brasil. Arch Latinoam Prod Anim. 2005; 13:63-69.
- Livermore DM, Pearson A. Antibiotic resistance: location, location, location. Clin Microbiol Infect. 2007; 13:7-16.
- Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol. 2010; 48:3822-23.
- Martinez MB, Trabulsi LR. *Enterobacteriaceae*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5.ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.271-80.
- Munoz MA, Ahlstrom C, Rauch BJ, Zadoks RN. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. J Dairy Sci. 2006; 89:3425-30.
- Munoz MA, Welcome F, Schukken Y, Zadoks RN. *Klebsiella* mastitis, an emerging disease. Northeast Dairy Business. 2008; 32-33.
- Nam HM, Lin SK, Kim JM, Joo YS, Jang KC, Jung SC. In vitro activities of antimicrobials against six important species of Gram-negative bacteria isolated from raw milk sample in Korea. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7:221-24.
- Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6:793-806.
- Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2012; 28:165-185.
- Pereira AS, Carmo Filho JR, Tognim MCB, Sader HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39:301-308.
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBL. Curr Opin Pharmacol. 2007; 7:459-69.
- Philpot WN, Nickerson SC. Vencendo a luta contra a mastite. Westfalia Landtechnik do Brasil: São Paulo. 2002.192p.
- Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. Ciênc Tecnol Aliment. 2006; 26:645-651.
- Pol M, Ruegg PL. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. J Dairy Sci. 2007; 90:249-261.

- Quinn PJ, Markey B, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary microbiology and microbial disease. 2.ed.UK:Willey-Blackwell, 2011. 928p.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine. A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10.ed. USA: Saunders Elsevier. 2007. 2156p.
- Ribeiro MG. Fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina clínica e subclínica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2001. 98p.
- Ribeiro MG. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade, S.F. (Ed). Manual de terapêutica veterinária. 3.ed. São Paulo: Roca; 2008. 759-71p.
- Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, Trynieszewska E. The KPC type  $\beta$ -lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in gram-negative bacilli. Folia Histochem Cytobiol. 2009; 47:537-43.
- Santos MV. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: Brito JRF, Portugal JAB. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos. CBQL: Juiz de Fora. 2003; 1:139-149.
- Sampimon OC, Saol J, Kock PA. An outbreak of *Klebsiella pneumonia* mastitis. Tijdschr Diergeneeskd. 2006; 131:2-4.
- Shah AA, Hansan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Res Microbiol. 2004;155:409-21.
- Silva VAM, Rivas PM, Zanela MB, Pinto AT, Ribeiro MER, da Silva FFP, Machado, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS. Acta Sci Vet. 2010; 38:51-57.
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewful J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. FEMS Microbiol Rev. 2010; 34:295-316.
- Souza V, Nader Filho A, Ferreira LM, Cereser ND. Características microbiológicas de amostras de tanque comunitário. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 61:758-61.
- Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SC, Hendriksen RS, Hald T, Wegener HC. Association between antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: An ecological study. Foodborne Pathog Dis. 2011; 8:1295-1301.

Villa FB. Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializados informalmente em Brotas, SP [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2007.

Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, McSweeney KD, Dinsmore RP, Goodell G, Callan RJ. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219:976-81.

Wilberger MS, Anthony KE, Rose S, McClain M, Bermudez LE. Beta-lactam antibiotic resistance among *Enterobacter* spp. isolated from infection in animals. *Adv Microbiol.* 2012; 2:129-137.

Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger PC, Woods G. Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1565p.

Yigit H, Queenam AM, Anderson GJ, Domenech-Sachez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:1151-61.