

Pesquisa de Escherichia Coli e outros microrganismos no leite materno cru e em amostras obtidas do epitélio da mama feminina em serviços de atendimento básico em saúde, no Município de Marabá – PA

Research on Escherichia Coli and other microorganisms in raw breast milk and for the benefit of female breast epithelium in basic health care services in the Municipality of Marabá – PA

DOI:10.34119/bjhrv5n1-013

Recebimento dos originais: 08/12/2021

Aceitação para publicação: 06/01/2022

Ana Sabrina Soares Fernandes

Possui graduação em medicina pela Universidade Estadual do Pará

Instituição: Universidade do Estado do Pará

Endereço: Av. Hiléia, s/n - Amapá, Marabá - PA, 68502 - 100

E-mail: anasabrina_soares@hotmail.com

Iago Braga Terceiro

Possui graduação em medicina pela Universidade Estadual do Pará

Instituição: Universidade do Estado do Pará

Endereço: Av. Hiléia, s/n-Amapá, Marabá-PA, 68502-100

E-mail: iagobraga3@hotmail.com

Luis Rodrigo de Sousa Papacosta

Possui graduação em medicina pela Universidade Estadual do Pará

Instituição: Universidade do Estado do Pará

Endereço: Av. Hiléia, s/n-Amapá, Marabá-PA, 68502-100

E-mail: papacosta_@hotmail.com

RESUMO

O leite materno é mais que um alimento, é uma fonte de vida que previne mortes infantis, promove saúde física, mental e psíquica da criança. Nesse contexto, tanto o epitélio da mama materna, quanto o seu leite deve ser livre de precursores patogênicos a fim de manter tais benefícios do leite. Deste modo, objetivam os autores verificar a presença ou ausência de contaminação por Escherichia Coli e outros microrganismos nas amostras de leite humano ordenhado e na pele da mama materna. Para tanto, foram coletados e postos em análise 20 pares de amostras de leite e epitélio mamário, bem como foi realizado um questionário socioeconômico com cada paciente. Para a coleta, materiais esterilizados e técnicas de assepsia para a ordenha do leite foi-se utilizado. Houve cultivo em Agar e coloração em lamínas para análises microscópicas. Os dados foram obtidos em duas unidades básicas de saúde do município de Marabá-PA. Observou-se que a incidência de microrganismos patogênicos, diferentes da Escherichia coli, eram preponderantes e que alguns estavam presentes tanto no epitélio quanto no leite. Assim, conclui-se que infecção destes dois meios analisados é um fator de perigo para a saúde da lactante e do lactente.

Palavras-Chave: Leite Materno, Epitélio Da Mama, Análise, Contaminação, Perigo A Saúde.

ABSTRACT

Breast milk is more than a food, it is a source of life that prevents infant deaths, promotes the child's physical, mental and psychological health. In this context, both the maternal breast epithelium and its milk must be free of pathogenic precursors in order to maintain such milk benefits. Thus, the authors aim to verify the presence or absence of contamination by *Escherichia Coli* and other microorganisms in samples of expressed human milk and in the skin of the maternal breast. Therefore, 20 pairs of milk and breast epithelium samples were collected and analyzed, as well as a socioeconomic questionnaire with each patient. For collection, sterilized materials and asepsis techniques for milking milk were used. There was culture on Agar and staining on slides for microscopic analysis. Data were obtained from two basic health units in the city of Marabá-PA. It was observed that the incidence of pathogenic microorganisms, different from *Escherichia coli*, was preponderant and that some were present both in the epithelium and in the milk. Thus, it is concluded that the infection of these two analyzed media is a danger factor for the health of the nursing mother and infant.

Keywords: Breast Milk, Breast Epithelium, Analysis, Contamination, Danger To Health.

1 INTRODUÇÃO

O leite materno é mais que um alimento, é uma fonte de vida que previne mortes infantis, promove saúde física, mental e psíquica da criança.

Estudos revelam que o aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida pode evitar, anualmente, mais de 1,3 milhão de mortes de crianças menores de 5 anos nos países em desenvolvimento (Lancet 2008, UNICEF).

Amamentar os bebês imediatamente após o nascimento pode reduzir em 22% a mortalidade neonatal – aquela que acontece até o 28º dia de vida – nos países emergentes. No Brasil, do total de mortes de crianças com menos de 1 ano, 69,3% ocorrem no período neonatal e 52,6%, na primeira semana de vida (UNICEF, 2007).

Tal fonte nutritiva reduz a incidência dos bebês adquirirem patologias como, infecções urinárias, alergias, diarreias, obesidade, distúrbios respiratórios, tudo isso graças a presença de nutrientes – como vitaminas, minerais, gorduras, açúcares, proteínas – substâncias e células maternas que funcionam como anticorpos contra infecções (FIOCRUZ, 2008).

Nessa perspectiva, o leite constitui um excelente meio de cultura que permite a multiplicação de várias espécies de microrganismos (COSTA et, al., 2004; SOUZA et, al., 2004; SANTOS, et, al., 2004).

No leite humano comumente são encontradas bactérias como *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus viridans* e *Escherichia coli* (SERAFINI et, al., 2003). Na quase totalidade das vezes, o mesmo microrganismo é isolado no leite humano e na pele da mama e do mamilo. Vale ressaltar que a microbiota da glândula mamária é constituída por bactérias benéficas que ascendem para a glândula através de um ducto interno. Uma vez iniciada a lactância, tais microrganismos são transferidos para o intestino dos lactentes. Um mecanismo relevante, o qual leva a formação da microbiota intestinal neonatal, é a modulação neuroendócrina. Esta comunica o sistema nervoso entérico e o sistema nervoso central, sendo chamada microbiota-intestino-cérebro (COLLINS Sm et, al., 2009).

Considera-se que o cérebro influencia na microbiota intestinal ao liberar neuropeptídios e hormônios, assim como a flora intestinal influencia na função cerebral - quanto ao seu comportamento e desenvolvimento. Nessa ótica, estudos revelam que os lactobacilos presentes no leite materno são indispensáveis para o funcionamento adequado do intestino do bebê (INDRIO F, 2013).

Quanto a patogenicidade, a microbiota do leite humano é classificada como saprófita ou patogênica (BRASIL,1988).

Apesar da excelência do leite humano, o desmame precoce é muito frequente no Brasil, sendo que a mediana de aleitamento predominante foi de 72 dias (SAUDE, 1997). Um dos fatores que leva a esse recorrente desmame precoce é a mastite, um processo infeccioso agudo das glândulas mamárias que acomete mulheres em fase de lactação, com achados clínicos que vão desde a inflamação focal, com sintomas sistêmicos como febre, mal-estar, astenia, calafrios e prostração, até abscessos e septicemia (SALES et al.,2000). No exame físico a parte afetada da mama apresenta-se avermelhada, quente, edemaciada e dolorida. A mastite tem início, geralmente, na segunda ou terceira semana do puerpério, podendo ocorrer, no entanto, em qualquer estágio da lactação (OMS, 2000).

As principais causas da mastite são a estase lática, causada por uma remoção ineficiente do leite, fator significativo para a instalação de agentes infecciosos como: *Staphylococcus Aureus* e *Escherichia Coli* (OMS, 2000). Neste caso dá-se destaque a

Escherichia Coli, um bastonete curto, gram-negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, maioria móvel, devido a existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é por volta dos 37 °C (BARNES et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005).

Tal bactéria caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, podendo realizar a respiração, além de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose (QUINN et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007). Elas são bactérias que normalmente vivem nos intestinos de pessoas e animais. A maioria das *Escherichia Coli* são inofensivas, na verdade, são uma parte importante do trato intestinal humano saudável. No entanto, algumas delas são patogênicas e podem causar doenças como diarreia ou infecções fora do trato intestinal (CDC, 2015).

A Patogenicidade da *Escherichia Coli* se manifesta por um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência, que variam de acordo com o sorotipo. O termo fator de virulência é impreciso, pois um único componente poderia não ser suficiente para transformar uma cepa de *Escherichia Coli* em patogênica, mas a combinação com outros determinantes de virulência teria um papel decisivo para sua patogenicidade (KUHNER et al., 2000; ROCHA, 2008).

Diversos estudos realizados em centros urbanos de países em desenvolvimento têm mostrado que os sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) são os principais agentes enteropatogênicos em crianças menores de dois anos de idade pertencentes às classes socioeconômicas menos favorecidas, acometidas de formas graves de diarreia aguda (BLACK et al., 1989; FAGUNDES et al., 1991).

Partindo desse pressuposto, observa-se que para manter todos os benefícios da amamentação é necessário que este leite esteja livre de precursores patogênicos, isto é, sem contaminações adversas, as quais advém do seio materno.

Assim torna-se preponderante a análise da presença da *Escherichia Coli* na mama materna e no seu leite da progenitora, a fim de certificar a viabilidade dessa fonte de alimento, do bem-estar materno e da possível elaboração de planos profiláticos – voltados a higiene e orientação das mães – nas unidades básicas de saúde. Dessa maneira, as lactantes e lactentes poderão, de fato, viver sem afecções.

2 MÉTODO

O presente trabalho foi realizado no Centro de Saúde Pedro Cavalcante e no Posto Laranjeiras. Realizou-se a coleta de dados em mulheres lactantes com bebês nas faixas etárias de 0 a 6 meses.

Todas as pacientes foram estudadas segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as Normas de Pesquisa Envolvendo os Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde após aprovação de anteprojeto pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão de Medicina e Comissão de Ética da UEPA, autorizado pelo secretário de saúde, senhor Nagib Mutran, pelas seguintes coordenadoras dos centros de saúde e pelas pacientes, por meio de termo de consentimento livre e esclarecido.

Nessa perspectiva, o anteprojeto da pesquisa foi apresentado e aprovado pelo Núcleo de Pesquisa da Universidade, pelo secretário de saúde do município de Marabá, pela comissão de ética médica e pela comissão de pesquisa experimental.

Após autorizações os estudos foram realizados no Centro de Saúde Pedro Cavalcante – referência no atendimento básico à saúde no município de Marabá-PA e zona rural adjacente – e Centro de Saúde Laranjeiras – o qual atende a população dos bairros liberdade e laranjeiras bem como a população rural. Vale ressaltar que a coleta de dados foi do tipo prospectivo, transversal e quantitativo.

Como critérios de inclusão foi padronizada a inclusão de mulheres puérperas de até 6 meses, que frequentam as Unidades Básicas de Saúde: Centro de Saúde Pedro Cavalcante e Posto de Saúde Laranjeiras, no Município de Marabá – PA e que também alimentam os filhos apenas com leite materno.

Para critérios de exclusão foi preconizada a exclusão de amostras visivelmente contaminadas ou apresentando sujidades aparentes; mulheres que oferecem outro tipo de alimento ao bebê até o sexto mês; pacientes que não aceitaram participar da pesquisa e pacientes que não se enquadram nos critérios de inclusão.

2.1 PROCEDIMENTOS

De acordo com a natureza dos dados analisados, os quais apresentaram um caráter quantitativo, utilizou-se para melhor interpretação dos resultados uma análise estatística descritiva, frisando os percentuais gerados no decorrer do trabalho.

O projeto de pesquisa foi desenvolvido seguindo etapas progressivas, todas estando de acordo e seguindo padrões recomendados pelos órgãos de saúde. Foram realizadas cinco etapas como parte da metodologia para obtenção e compreensão dos resultados:

- 1- Preparação dos meios de cultura
- 2- Teste de controle
- 3- Coleta, estocagem e transporte do leite
- 4- Inoculação e incubação das amostras
- 5- Análise microbiológica

2.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura são preparações químicas, contendo soluções e substâncias nutritivas (proteínas e outras macromoléculas) direcionados especificamente para certos microorganismos, permitindo o crescimento e multiplicação destes com o objetivo de proporcionar estudo e análise.

Para a preparação dos meios de cultura que receberam as amostras do epitélio da mama materna e do leite cru foi utilizado o ágar eosina azul de metileno (EMB), com a finalidade de isolar os principais microorganismos gram-negativos encontrados nas diferentes amostras, especialmente as enterobactérias, sendo as colônias de *Escherichia coli* de mais fácil identificação por conta da coloração verde característica.

Na obtenção de quantidade adequada de pó foi utilizada uma balança de precisão nas dependências do laboratório de química da Universidade do Estado do Pará (UEPA) – campus VIII, localizado na cidade de Marabá (PA), conseguindo uma massa de 60,023g. Essa quantidade foi dividida em seis partes, obtendo massa de 10,0038333g e colocadas em erlenmeyers de 250ml, recipiente que foi utilizado para diluição do material. A água destilada, composto utilizado para a diluição do ágar, foi posto em uma proveta com um volume total de 1500ml e conseqüentemente distribuído entre os erlenmeyers. Como auxílio no processo de diluição e formação de uma solução foi usado

uma baqueta (bastão) para agitar e facilitar as dissoluções ou manter massas líquidas em constante movimento.

Antes de autoclavar a solução obtida foram feitas medições do pH em um aparelho denominado de phmetro, constituído basicamente por um eletrodo e um circuito potenciômetro. A mistura homogênea encontrava-se fora dos padrões recomendados de pH, o que possivelmente influenciaria de forma negativa no crescimento de micro-organismos que estavam nas amostras. Ela encontrava-se com um pH de 6,1 enquanto o recomendado era 6,8 (com um intervalo de confiança de 0,2 para mais e para menos). Desta forma foi necessário realizar um procedimento para corrigir esse valor e colocar a mistura dentro do que seria recomendado; para isso utilizamos NaOH (hidróxido de sódio), caracteriza-se por ser uma base de Arrhenius muito forte, portanto, utilizada para neutralizar ácidos ou tornar rapidamente alcalino um meio reacional, mesmo que em poucas concentrações. Este composto foi diluído em água destilada e posteriormente adicionada em pequenas quantidades à solução de ágar, sempre sendo feitas as medições no equipamento. Por fim chegou-se em um pH de 6,7, valor que estava dentro da faixa de confiança e com isso a solução estava preparada para o processo de esterilização.

Depois de realizados todos esses processos, o passo seguinte foi a esterilização de todos os equipamentos e materiais, com o intuito de destruir todas as formas de vida microbianas (vírus, bactérias, esporos, fungos, protozoários e helmintos) para que as amostras não sofressem um processo de contaminação cruzada e os resultados obtidos não fossem de certa forma incorretos. Esse procedimento foi realizado utilizando uma autoclave, equipamento muito comum em laboratórios e hospitais que permite o contato do material contaminado a ser esterilizado com vapor de água em temperaturas altíssimas (em torno de 121°C) ocasionando assim a morte dos micro-organismos. Ele é formado por um cilindro metálico resistente, vertical ou horizontal, onde geralmente fica a resistência que aquecerá a água. Possui uma tampa que apresenta parafusos de orelhas e permite fechá-la hermeticamente. Em cima da tampa estão as válvulas de segurança e de ar. Apresenta também uma chave de comando para controlar temperatura e um registro indicador de temperatura e pressão.

Esse procedimento também demanda algumas fases, que foram todas cumpridas para chegar a uma esterilização correta. A primeira destas fases foi a preparação de todos os equipamentos e materiais (pipetas, erlenmeyer contendo a solução com ágar, bastão e

placas de petri) para serem autoclavados. Todos esses instrumentos citados foram envoltos por duas camadas de papel alumínio e amarrados com fios de barbante. Os erlenmeyers foram tamponados com algodão e gaze, posteriormente envoltos com papel alumínio e amarrados com barbante, pratica realizada para que a solução fosse desinfetada, pois o fechamento dos recipientes não permitiria a esterilização.

A segunda fase consistiu na adição de quantidade adequada de água destilada na máquina, até o nível da resistência, como forma de prevenir a oxidação do metal.

A terceira fase foi o fechamento da tampa com os parafusos de orelha, procedido pelo ligamento da autoclave em temperatura máxima. Determinado momento começou a sair jatos de ar, ao fim deles as válvulas foram fechadas, dessa forma a pressão e a temperatura começaram a subir.

Na quarta fase esperamos 20 minutos até ela atingir a temperatura de 121°C, depois disso esperamos mais 20 minutos até que todos os objetos fossem totalmente desinfecionados. Ao final esperamos a temperatura diminuir para abrir e retirar os materiais. Esse procedimento demandou dois turnos, com aproximadamente 60 minutos cada, sendo que os erlenmeyers foram postos na segunda vez, por conta do rápido processo de solidificação da solução. As ferramentas retiradas, úmidas, foram postas em bancadas e deixadas para secar em temperatura ambiente.

O último passo no método de preparação dos meios de cultura foi a deposição do ágar liquido e quente nas placas de petri até que toda substância se esgotasse. Foram preenchidas 70 placas, sendo 50 de tamanho pequeno (15ml) e 20 de tamanho médio (30ml). Quase todas as placas foram guardadas em um refrigerador e mantidas em temperatura baixa, como forma de impedir a contaminação e o desenvolvimento de bactérias. As demais foram reservadas para o procedimento de teste controle.

Na realização desta etapa todas as bancadas utilizadas foram desinfetadas com álcool 70% e os participantes fizeram uso correto de equipamentos de proteção individual, entre os quais estão: jaleco, luvas de procedimento, touca e máscara, como forma de impedir a contaminação dos meios.

Figura 1 - Erlenmeyers contendo o ágar diluído com água destilada



Fonte: Acervo Próprio

2.3 TESTE DE CONTROLE

Para realizar a etapa de teste controle, foi retirado três placas as quais foram colocadas em uma estufa à temperatura de aproximadamente 37 ° C (FIGURA 2) por cerca de 72 horas, com o intuito de apurar se houvera ou não o crescimento de algum microorganismo. Realizado isto, verificou-se nenhuma proliferação nos meios de cultura esterilizados, mostrando-se propícios para inoculação das amostras de epitélio da mama e leite cru.

Figura 2 - Estufa em que foram mantidas as amostras.



Fonte: acervo próprio.

Em uma das três placas inoculou-se a bactéria *Escherichia coli* para verificar se o crescimento seria eficaz, a qual foi colocada na estufa novamente; após 48 horas foi retirada constatando-se resultados positivos para o crescimento da bactéria citada.

Figura 3 – verificado o crescimento de escherichia coli (verde).



Fonte: acervo próprio.

Portanto, o processo de testes mostrou que os materiais estavam isentos de qualquer contaminação que viesse a dar um falso positivo, além de ter propiciado o desenvolvimento correto do micróbio, viabilizando o desenvolvimento e prosseguimento do trabalho.

2.4 COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE DO LEITE

A coleta dos dados seguiu duas fases, a primeira correspondeu em um questionário socioeconômico feito as mulheres que se encaixaram em todos os critérios de inclusão da pesquisa. Tal questionário continha um total de vinte perguntas (ANEXOS) das mais diversificadas, ao fim do interrogatório as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando com a participação da pesquisa. A segunda fase foi o procedimento de obtenção das amostras do epitélio da mama materna e do leite cru.

A coleta do tegumento do seio é uma forma importante para detectar como está sendo realizado o processo de higienização desta, e como isto influencia em algumas afecções, tanto na lactante quanto no lactente. Este procedimento foi realizado por uma equipe de saúde devidamente orientada e paramentada, tendo início com a passagem do swab de plástico cirúrgico (umidificado com 0,5 ml de soro fisiológico) ao redor da auréola e do bico do seio materno. Com o auxílio de um conta gotas, 1,5 ml de soro fisiológico estéril foi colocado no tubo de ensaio para conservar as propriedades biológicas do material colhido. Este recipiente foi tamponado com um algodão

esterilizado, identificado com o número da paciente por uma fita colante e colocado em uma estante para tubo de ensaio dentro de um isopor resfriado com gelol.

A ordenha do leite humano é caracterizada pela ação de manipular a mama lactante pressionando-a de forma cuidadosa para a retirada do leite. Esse procedimento foi realizado pela própria nutriz, denominado de auto-ordenha, ou por um profissional de saúde devidamente orientado. A ordenha foi realizada com as mãos, por ser econômica, atraumática e menos dolorosa, além de reduzir possíveis riscos de contaminação oriundos de extratores de leite que não foram devidamente esterilizados (OLIVEIRA et al., 2006). Tal procedimento iniciou com a limpeza da pele materna utilizando gaze estéril molhada com um produto que possui ação antisséptica, Clorexidina degermante a 0,2%, e a posterior retirada desse produto com gaze estéril umidificada com soro fisiológico estéril por conta da formação de bolhas de sabão. Isto foi uma forma encontrada para que o leite ordenhado não fosse contaminado por qualquer tipo de microrganismo que pudesse estar presente no epitélio.

Logo após realização dessa assepsia partiu-se para o procedimento da retirada do leite, em que se procurou mudar de um em um minuto, aproximadamente, a posição dos dedos (de superior e inferior para lateral direita e esquerda, e para a posição oblíqua), buscando retirar o leite de todo o peito. Foi utilizado um coletor estéril que era colocado próximo a mama, com boca larga, tampa plástica vermelha e rosqueável contendo um volume total de 60 ml, não sendo necessário o preenchimento de toda a capacidade do frasco, ocupando apenas de 1 a 3 cm do recipiente.

A amostra obtida foi enumerada (FIGURA 5), acondicionada em um isopor sobre refrigeração feita por gelol com o objetivo de impedir alterações físico-químicas, microbiológicas e imunológicas.

O transporte das amostras até o local de análise não ultrapassou o tempo de 3 horas, os produtos foram transportados em recipientes resistentes, constituídos por uma resina termoplástica, que conservou a temperatura baixa com o auxílio de gelol congelado, assegurando a manutenção das características microbiológicas do material coletado.

Figura 4 – amostras do epitélio e do leite materno.



Fonte: acervo próprio.

Dessa forma, esses foram conduzidos com rigor higiênico-sanitário capaz de garantir a manutenção das características imunobiológicas do produto (ALENCAR, 2008). Sendo assim, no processo de coleta das amostras foram utilizados os seguintes métodos e produtos:

- Lavagem das mãos e antebraços com água corrente e sabão;
- As unhas estavam curtas e limpas;
- Os cabelos estavam presos com touca e a boca e narinas protegidos com máscara;
- Utilização de luvas tanto pela própria nutriz quanto pela equipe de saúde;
- Utilização exclusiva de utensílios (conta gotas, tubos de ensaio e algodão) previamente esterilizados para a coleta do leite humano;
- Troca de todos os equipamentos de proteção individual a cada paciente;
- Identificação das amostras através de fitas adesivas contendo apenas o número da paciente, mantendo dessa forma intacto e em sigilo os dados pessoais.

Figura 5 – amostra do leite materno mostrando a forma de identificação utilizada.



Fonte: acervo próprio.

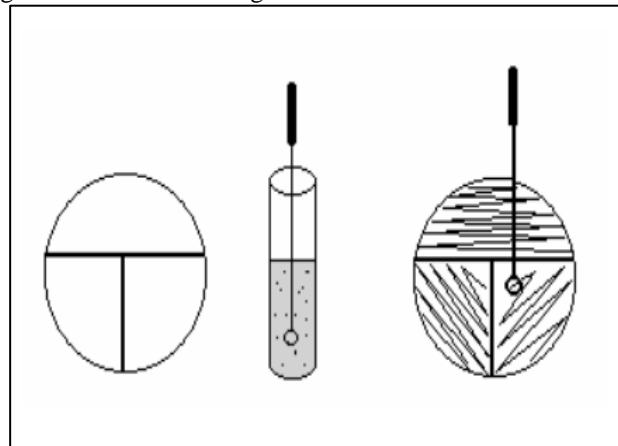
2.5 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS

Imediatamente após chegar ao laboratório teve início o processo de inoculação das amostras nos meios de cultura anteriormente produzidos e que estavam sendo conservados em um refrigerador.

A técnica utilizada para realizar o processo de semeadura é denominada de esgotamento em estrias ou estrias múltiplas, especificamente o executado com três estrias, que consistiu em fazer estrias em metade da placa, com movimentos de zig-zag. Quando atingido a metade da placa, girou-se em 90° e se estriou até a metade (1/4 da placa), girando mais 90° e estriando o meio restante (FIGURA 6).

Esta técnica é usada fundamentalmente para se obter (isolar) culturas puras de amostras que contenham microbiota mista, sendo igualmente útil para o estudo da morfologia colonial. A superfície do ágar nas placas encontrava-se lisa e úmida, porém sem umidade excessiva, uma vez que isso poderia ocasionar um crescimento confluyente. Além da não perfuração do meio na inoculação, pequena quantidade de material foi pego para semear, isto como forma de se obter resultados satisfatórios.

Figura 6 – Técnica De Esgotamento Executado Em Três Estrias

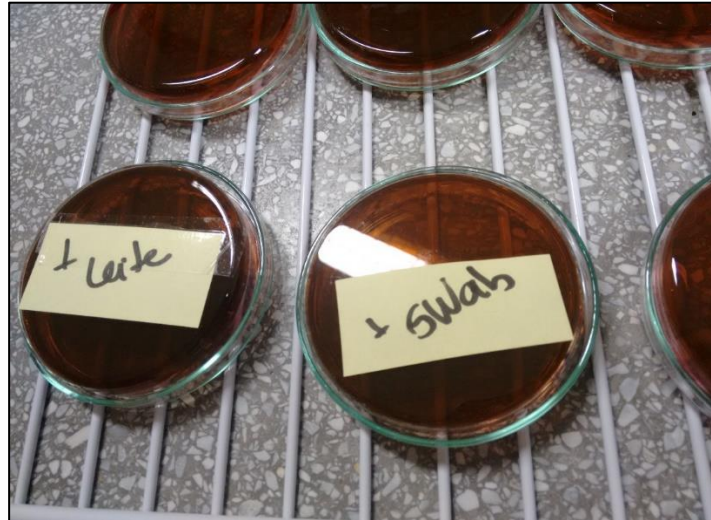


Fonte: universidade federal do ceará, curso de odontologia.

Na inoculação foram utilizados alças e agulhas bacteriológicas, devidamente flambados até ficarem rubros, procedimento repetido no início e fim de cada inoculação. O instrumento que continha a chama para a esterilização é denominado de lamparina e o combustível utilizado foi álcool 99,9 %, os praticantes mantiveram-se em uma zona de segurança (torno de 10 cm) ao redor da chama procurando evitar qualquer tipo de acidente.

Todas as placas semeadas foram devidamente identificadas com papel e fita durex presa na superfície externa, identificação realizada tanto através do número da paciente quanto se eram do epitélio ou do leite; forma encontrada como forma de controle em relação as amostras e posteriormente análise correta. Exemplo: 1 - leite ou 1 - swab, 2 - leite ou 2 - swab, e assim sucessivamente até a amostra número 20.

Figura 7 – identificação das placas de petri.



Fonte: acervo próprio.

Após a realização da identificação e semeadura, todas as placas foram postas dentro de uma estufa à temperatura aproximada de 37°C, com o fundo virado para cima. Assim permaneceram por volta de 72 horas para a subsequente colheita dos resultados, possibilitando condições para o crescimento microbiano adequado.

A inoculação das amostras do epitélio da mama materna e do leite cru ordenha também foram feitas em vinte lâminas de vidro, com o intuito de realizar subsequentemente uma análise microbiológica, buscando encontrar quais os tipos de microorganismos presentes. Para isso foi utilizado o swab cirúrgico de plástico como instrumento de inoculação, ambos com as amostras foram introduzidos no centro das lâminas e feitos movimentos circulares para espalhar o conteúdo. Após esse procedimento, todas as lâminas foram flambadas, como forma de secar o meio, colocadas dentro de uma estufa a temperatura de 37°C e ficaram esperando o processo de cultura e análise.

Algumas regras foram seguidas para que essa análise fosse realizada de forma correta:

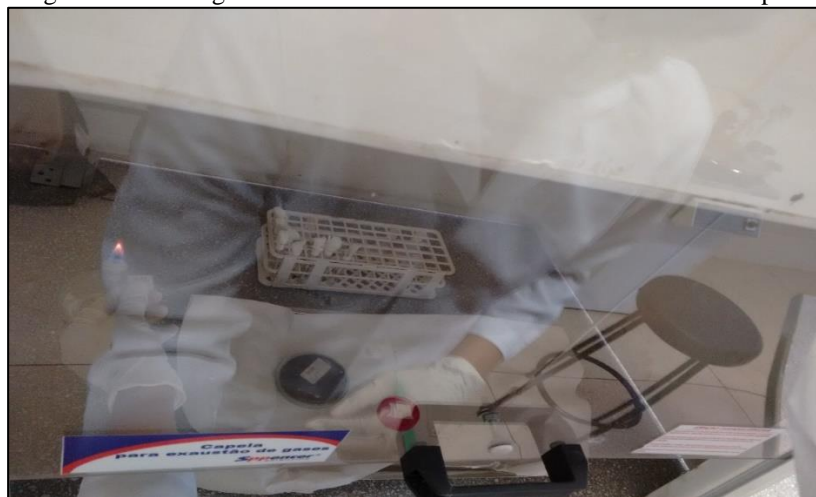
- Toda a equipe utilizou equipamentos de proteção individual (jaleco, luvas de procedimento, máscara e gorro);
- As bancadas foram desinfetadas com soluções desinfetantes próprias;
- Os recipientes (placas e lâminas) foram abertos próximos da chama da lamparina, ficando o mínimo de tempo possível em cima das bancadas.

Figura 8 – semeadura do leite materno ordenhas nos meios de cultura.



Fonte: acervo próprio.

Figura 9 – flambagem das laminas contendo as amostras dentro da capela.



Fonte: acervo próprio.

Figura 10 – placas com os meios semeados retornaram para a estufa.



Fonte: acervo próprio.

2.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Nesta etapa as lâminas que estavam armazenadas na estufa foram coradas para a realização da análise microbiológica. A técnica utilizada denomina-se de coloração diferencial, especificamente coloração de gram, como forma de separar as bactérias em dois grupos distintos: gram positivas e gram negativas.

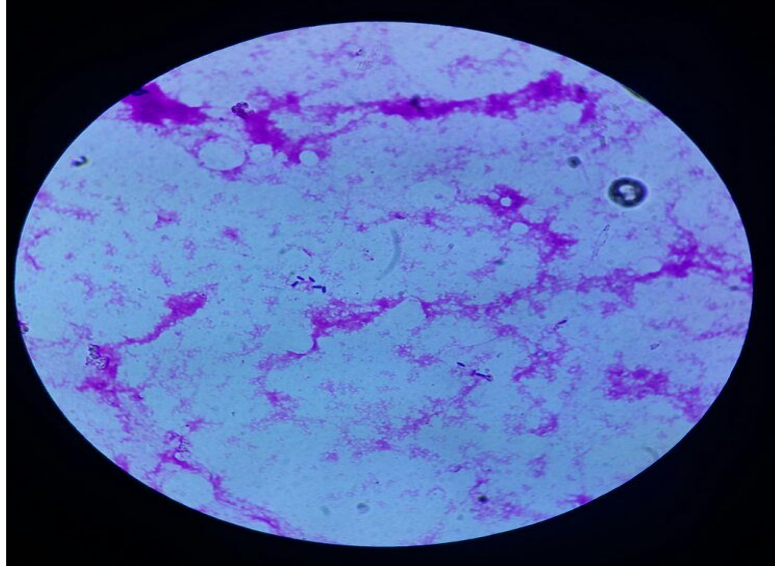
Neste procedimento foram realizadas as seguintes fases, em ordem:

- Aplicação de cristal violeta (corante púrpura) com um tempo de espera de um minuto, com finalidade de impregnar as células;
- Utilização de lugol (solução de iodo) por um período de um minuto, um mordente que possui como a intenção de intensificar a cor do corante primário;
- Lavagem com uma solução de álcool-acetona por cerca de trinta segundos, com a função de descolorir e remover o purpura de algumas células, mas não de outras;
- Limpeza das lâminas e consequente aplicação de um corante de contraste, fucsina fenicada de gram, buscando corar aquelas células que não adquiriram coloração;
- O esfregaço é lavado novamente, seco com papel e examinado microscopicamente.

O exame ao microscópio óptico composto foi feito por luz transmitida, onde a luz atravessou as lâminas e atingiu a objetiva, produzindo imagem e permitindo a visualização e diferenciação das células.

Neste processo foi observado a presença de cocos gram positivos isolados e aos pares; bacilo gram positivo e negativo curtos e longos, além de leveduras.

Figura 12 – Bacilos Gram Positivos Curtos Presentes Em Amostras De Leite



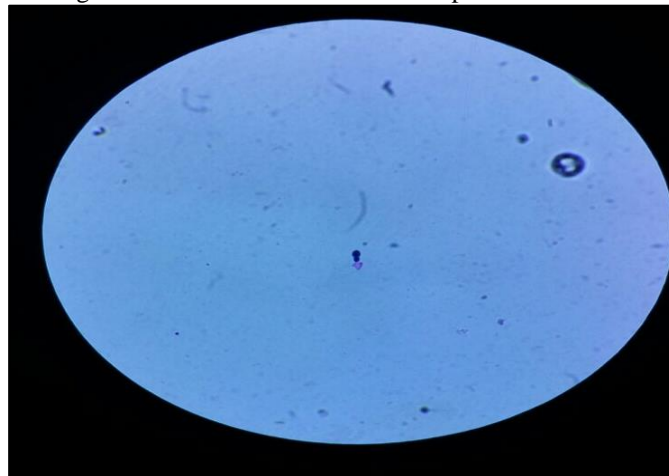
Fonte: Acervo Próprio

Figura 13 – staphylococcus sp.



Fonte: acervo próprio.

Figura 14 – levedura encontrada no epitélio da mama.



Fonte: acervo próprio.

3 RESULTADOS

Foram pesquisados a presença ou ausência de *Escherichia coli* e outros microrganismos no epitélio da mama e no leite materno, isto é, foi feita uma análise microbiológica dos dados coletados. Vale destacar também que foi realizado um questionário socioeconômico com as participantes da pesquisa.

Tabela 1 – Presença Ou Ausência De *Escherichia Coli* E Outras Bactérias No Leite Materno

AMOSTRAS	BGNL(R)*	<i>Escherichia coli</i>	CGPIP(R)**	ERITRÓCITOS	BGPC(R)***	TOTAL
1	-	-	-	-	-	0
2	-	-	-	-	-	0
3	-	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	-	0
6	+	-	-	-	-	1
7	-	-	-	-	-	0
8	-	-	+	+	-	2
9	-	-	+	-	+	2
10	-	-	-	-	+	1
11	-	-	-	-	-	0
12	-	-	+	-	+	2
13	-	-	-	-	+	1
14	-	-	-	-	+	1
15	-	-	-	-	-	0
16	-	-	-	-	+	1
17	-	-	-	-	-	0
18	-	-	-	-	-	0
19	-	-	+	-	-	1
20	-	-	-	-	+	1
Total	1	0	4	1	7	13
%	7,7%	0%	30,78%	7,7%	54%	100%

Fonte: Análise Microbiológica Própria *Bacilos Gram Negativos Longos (Raros) / **Cocos Gram Positivos Isolados E Aos Pares (Raros) ***Bacilos Gram Positivos Curtos (Raros) / - Ausente / + Presente

Tabela 2 – Presença Ou Ausência De Escherichia Coli E Outros Microrganismos No Epitélio

AMOSTR AS	BGPC(R)*	BGNC(R)**	LEVEDUR AS	CGPIP(R) ¹	CGPIP(F) ²	<i>Escheric hia coli</i>	<i>Staphyll us</i>	TOT AL
1	+	-	+	-	-	-	-	2
2	-	+	-	-	-	-	-	1
3	-	+	-	-	-	-	-	1
4	-	-	-	+	-	-	-	1
5	-	+	-	+	-	-	+	3
6	-	+	-	-	+	-	-	2
7	-	+	+	+	-	-	-	3
8	-	-	-	+	-	-	-	1
9	-	-	-	+	-	-	-	1
10	-	-	-	+	-	-	-	1
11	-	-	-	+	-	-	-	1
12	+	-	-	+	-	-	-	2
13	-	-	-	+	-	-	-	1
14	+	+	-	+	-	-	-	3
15	-	-	-	+	-	-	-	1
16	-	-	-	+	-	-	-	1
17	-	-	-	+	-	-	-	1
18	+	-	-	+	-	-	-	2
19	+	-	-	+	-	-	-	2
20	+	-	-	+	-	-	-	2
Total	6	6	2	16	1	0	1	32
%	18,75%	18,75%	6,25%	50%	3,125%	0%	3,125%	100%

*Bacilos Gram Positivos Curtos e Longos (Raros) / **Bacilos Gram Negativos Curtos (Raros) / ***Bacilos Gram Positivos Curtos e Irregulares (Raros) / ¹Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares (Raros) / ²Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares (Frequentes) / ³Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares e aos Cachos (Raras)

Tabela 3 – Distribuição Das Pacientes Que Participaram Da Pesquisa Segundo Presença De Mastite, Orientações Sobre Esse Processo Infeccioso, Aleitamento E Higiene Mamária

Variável	Nº	%
Teve e/ou tem mastite	2	10%
Sabe o que é mastite	2	10%
Teve orientações de como amamentar	15	75%
Sabe fazer a higiene da mama	13	65%

Fonte: Dados Coletados Com O Questionário

Tabela 4 – Distribuição Das Pacientes Que Participaram Da Pesquisa Segundo A Idade, Escolaridade E Classe Social

Variável		
Idade	Média = 24	
	Mediana= 22,5	
	Mínimo = 16	
	Máximo = 41	
Escolaridade	Nº	%
Fundamental Completo	1	5%
Fundamental Incompleto	2	10%
Ensino Médio Completo	12	60%
Ensino Médio incompleto	2	10%
Ensino Superior Completo	2	10%
Ensino Superior Incompleto	1	5%
Classe Social		

Figura 15 – os meios não apresentaram crescimento para escherichia coli.



Fonte: acervo próprio.

4 DISCUSSÃO

Por ser uma fonte de vida o leite deve estar livre de conteúdos potencialmente patogênicos. Partindo desse pressuposto, avalia-se a necessidade de uma análise da microbiota presente no leite humano cru e na pele da mama materna para identificar a presença ou ausência de Escherichia coli e outros microrganismos com caráter prejudicial

a lactante e ao lactente. Nesse âmbito, identificara presença de micróbios nas amostras é uma das formas de correlacionar a possíveis afecções no bebe e/ou na mãe e aplicar possíveis medidas corretivas, que vão desde uma higienização correta até um tratamento adequado e eficaz.

Nessa perspectiva, as amostras coletadas disponibilizaram análises ricas, as quais só corroboram o trabalho. Tanto o leite, quanto o epitélio apresentaram contaminações com diferentes tipos de microrganismos, os quais não compõe nem o leite ou o epitélio normais, destaca-se nesse sentido a presença de bactérias raras e leveduras.

Com relação a incidência bacteriana, observou-se que Bacilos Gram Positivos Curtos (raros) estavam presentes na maioria das laminas contendo leite humano. Uma alerta a saúde do bebê, pois este grupo de bactérias, em geral, causa danos a homeostasia seja por promover intoxicação alimentar ou por tornar propicio desarranjos intestinais. Sendo estes, tidos como uma das principais patologias, a qual acomete crianças de 0 a 6 meses de idade (OMS,1999).

Detectou-se também com incidência significativa Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares, os quais não devem ser encontrados em um leite saudável. Tais cocos costumam causar pneumonia, infecções purulentas na superfície da pele ou em órgãos internos e também meningite bacteriana-patologia de caráter mortal se não tratada a tempo.

Bacilos Gram Negativos Longos foram detectados em menor quantidade. Esses bacilos são conhecidos por ocasionar diarreias, meningites neonatais e infecções no trato gastrointestinal.

Nessa perspectiva, o leite materno pode sim estar contaminado por microrganismos indutores e/ou potencialmente patogênicos e o próprio Lin et.al (1988), em análise do perfil microbiológico de leite humano, ratifica o exposto ao também identificar germes nesse alimento.

Eritrócitos detectados podem ser associados a mastite ou rupturas no bico do peito da mãe. Nas culturas avaliadas não houve proliferação *Escherichia coli*.

Já em relação aos resultados obtidos a partir do epitélio da mama, sobre estes, vale ressaltar que a maioria deu positivo para bacterioscopia, com predomínio dos bacilos Gram Negativos Curtos e dos Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares, ambos raros no epitélio. Tanto os bacilos, quanto os cocos com caráter infeccioso costumam liberar

toxinas e causam a destruição de leucócitos, levando a depleção dos mecanismos imunológicos.

Identificou-se também leveduras em certas laminas, tais fungos podem ter proliferado na região da mama devido o contato contínuo de fraldas, panos ou absorventes de seio – estes, em geral, ficam úmidos pela ejeção de leite – com o peito da mãe. Tal situação cria um nicho favorável a vida destes microrganismos. Outra probabilidade é a baixa imunidade das pacientes e a estase láctica – comum nos primeiros meses de amamentação - características propícias a infecções fúngicas. Dentre os efeitos da contaminação por leveduras cita-se: a mastite e micoses localizadas na mama e/ou no bico do peito. Esses acometimentos causam um imenso desconforto a lactante devido a coceira, dor e incômodos durante a amamentação.

Foi encontrado *Staphylococcus* sp em certas laminas de análise, as bactérias dessa espécie apesar de seu grau de patogenicidade, podem estar presentes no epitélio por um longo período sem causar reações adversas. Em alguns casos, porém, ela ocasiona abscessos dolorosos no bico do peito de mães, com destaque para aquelas primigestas.

Bacilos Gram Positivos Curtos e Longos (Raros) e Bacilos Gram Positivos Curtos e Irregulares (Raros) encontrados na mesma proporção durante a busca dos resultados nas laminas epiteliais. Em contrapartida, esses dois grupos bacterianos são incomuns a região mamária, diferente dos Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares, frequentes nesta região e, nessa perspectiva não causam nenhuma intercorrência.

A contaminação do epitélio pelos microrganismos citados advém de possíveis hábitos higiênicos inadequados, por exemplo: o ato de tocar os seios sem lavar as mãos (sendo que estas podem ter entrado em contato com secreções corporais contaminadas, superfícies sujas ou alimentos infectados); descuido na limpeza das roupas e até o fato de utilizá-las várias vezes sem lavar; baixa frequência de banhos diários e assepsia correta dos mamilos, bem como o uso ininterrupto de absorventes ,toalhas para evitar o vazamento de leite materno.

Todas as situações esplanadas atuam como meios férteis para patógenos no epitélio da mama. Nisto, o fato interessante é que tais micróbios infectam também o leite da mãe – mesmo este contendo anticorpos como as imunoglobulinas. Nessa ótica, tal observação ganha embasamento nos próprios resultados obtidos a partir da análise dos

dados coletados, nos quais tanto as amostras de leite quanto as de epitélio apresentaram bacilos Gram Negativos Curtos e Cocos Gram Positivos Isolados e aos Pares.

Diante do exposto, a realização de palestras de cunho orientador, explicativo e sensibilizador com enfoque na correta higienização das mamas, são de caráter preponderante para a erradicação de tais contaminações, as quais debilitam o estado de saúde da lactante e do respectivo lactente. As palestras devem ser centradas nas formas de assepsia e antissepsia das mãos e mamilos, no esclarecimento de dúvidas frequentes – como o tempo ideal para a troca dos lenços descartáveis para o seio ou quais produtos utilizar para o asseio.

Ao analisar os dados do questionário observa-se que a idade média das participantes da pesquisa é de 24 anos, sendo a mínima 16 e a máxima 41. Quanto a informações sobre higiene pessoal e maneiras adequadas de aleitamento, a maioria delas afirma ter conhecimento sobre essas questões. Contudo, as amostras revelam o contrário, haja vista que a ausência de práticas de limpeza adequadas é a principal via para proliferação microbiana na pele e a consequente contaminação do leite oferecido ao recém-nascido.

5 CONCLUSÃO

A contaminação por *Escherichia coli* nas amostras analisadas é ausente. Entretanto, a presença de outros microrganismos contaminantes, como bactérias diversas e fungos, no leite humano ordenhado e na pele da mama materna são significativas devido a observação da alta prevalência dos mesmos nas amostras maternas e as relações com a inconstância no estado de saúde da mãe e do bebê.

REFERÊNCIAS

Agência nacional de vigilância sanitária. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf>. Acesso em: 4 de junho de 2016.

Alencar, sonia maria salviano matos de. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília, 2008.

Andreatti filho, I. R. Saúde aviária e doenças. São paulo: roca, 2007. Vol. 10, p. 112-117. Brasil, agência nacional de vigilância sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos/ agência nacional de vigilância sanitária- brasília, 2008.

Brasil. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, secretaria de defesa agropecuária, 2003.

Brasil, ministério da saúde nacional de vigilância sanitária. Resolução rdc nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de leite humano. Diário oficial da união: poder executivo, de 05 de setembro de 2006.

Barnes, h. J.; vaillancourt, j. P.; gross, w. B. Colibacillosis in: saif w. M. Diseases of poultry. (11ª ed.). Iowa, p. 138-144, 2003.

Black re, lopes de romana g, brown kh. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in huascar, peru. Am j epidemiol 1989; 129(4):785-99.

Brasil. Ministério da saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Portaria n. 322, de 26 de maio de 1988. Aprova as normas gerais para regular a instalação e funcionamento de bancos de leite humano.

Brown, a. E. Benson microbiological applications – laboratory manual in general microbiology. 8th edition. The mcgraw–hillcompanies, 2001.

(cdc, 2015). Centers for disease control and prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/>. Acesso em: 06 fev. 2016. Hora: 14:41.

Collins sm, bercik p. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. Gastroenterology.2009; 136:2003-14.

Difco & bbl manual. Manual of microbiological culture media. Maryland: becton, dickinson and company, 2003.

Fagundes neto u, oliva cag, gallo p et al. Mortalidade infantil por diarréia. Rev paul pediatr 1991; 9: 101-11.

Filho, g. N. S., microbiologia. Manual de aulas práticas. Ed.da ufsc, 2004.

Fiocruz, ministério da saúde. Programa nacional de qualidade em bancos de leite humano, 2003.

Franco, b.d.g.m.; landgraf, m. Microbiologia de alimentos. São paulo: atheneu, 1996. 182 p. (fiocruz, 2008). Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=571&sid=368>>. Acesso em: 06 fev. 2016; hora: 12:47.

Guimarães, v.; almeida, j. A. G.; novak, f. R. Normas técnicas para o banco de leite humano. Rio de janeiro, sn. 2006. Disponível em <<http://www.bvsm.icict.fiocruz.br/normastecnicas/higieneconduta.pdf>>. Acessado em:20/04/2016.

Harley, j. P. Prescott, l. M. Laboratory exercises in microbiology. 5th edition. The mcgraw-hillcompanies, 2002.

Indrio f, riezzo g, raimondi f, di mauro a, francavilla r. microbiota involvement in the gut-brain axis. Jpgn. 2013; 57:11-4.

Isenberg, h. D. (ed.) Clinical microbiology procedures handbook. 2nd ed. Washington dc: asm, 2004.

Kuhnert, p.; boerlin, p.; frey, j. Target genes for virulence assessment of escherichia coli isolates from water, food and the environment. Fems microbiology reviews, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

Manual oxid. São paulo: oxid brasil ltda., 2000. Murray, p. R. Et al. (eds) manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington d.c.: asm, 2007.

Ministério da saúde. Manual de promoção do aleitamento materno: normas técnicas. 2ª ed. Brasília; 1997. P.6.

Morello, j. A.; granato, p. A.; mizer, h. E. Laboratory manual and workbook in microbiology: applications to patient care. 7th edition. The mcgraw-hill companies, 2003.

Nccls. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. 2 nd ed. Nccls document m22-a2. Wayne, pa: nccls, 1996.

Oliveira, w.f. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do estado do ceará, brasil. Rpcv (2004) 99 (552) 211-214.

Oliveira, m. I. C. Et al. Manual de capacitação de multiplicadores na iniciativa unidade básica amiga da amamentação. Rio de janeiro: fiotec, 2006. V. 1. 215 p.

Pilonetto, m.; pilonetto, d. V. Manual de procedimentos laboratoriais em microbiologia – pops em microbiologia. Curitiba: microscience, 1998.

Quinn, p.j.; markey, b.k.; carter, m.e.; donnelly, w.j.; leonard, f.c. microbiologia veterinária e doenças infecciosas. 1ª ed. Porto alegre: editora artmed 512p, 2005.

Rocha, s.l.s. detecção de fatores de virulência de amostras de escherichia coli isoladas de granjas avícolas do rs através do multiplex-pcr. Dissertação de mestrado. 2008. 68 f. Universidade do rio grande do sul.

Sales, a.n.; et al.mastite puerperal: estudos de fatores predisponentes. Rbgo, v.22, n.10, p.627-632,2000.

Serafini, a.b.; andré, m.c.d.p.b.; rodrigues, m.a.v.; kipnis, a.; carvalho, c.o.; campos, m.r.h.; monteiro, e.c.; martins, f.; jube, t.f.n. qualidade microbiológica do leite humano obtido em banco de leite. Saúde pública, goiânia, v.37, n.6, p. 775-779, dez. 2003.

Silva, n.; cantúcio, r.n; junqueira, v.c.a.; silveira, n.f.a. manual de métodos de análise microbiológica da água. São paulo: varela, 2005. 164p.

Tortora, g. J., funke, b. R., case, c. L.. Microbiologia. 10ed. Porto alegre – artmed, 2012. Trabulsi, l. R.; althernun, f. Microbiologia. 4ª edição. Editora atheneu. 2004. - bossolan, n. R. S. Introdução à microbiologia. Ifsc – Ice – disciplina biologia 3. 2002.

(unicef, 2007). Disponível em: <http://www.unicef.org/brazil/pt/activities_10003.htm>. Acesso em: 27 fev. 2016. Hora: 17:42.

Universidade federal do ceará, curso de odontologia. Preparação de meios de cultura. Disponível em: <<http://www.odontologiasobral.ufc.br/wp-content/uploads/2010/06/isolamentobacteriano.pdf>>. Acesso em: 4 de junho de 2016. Universidade federal fluminense, instituto biomédico. Técnicas de semeadura e meios de cultura. Disponível em: <<http://www.uff.br/bacteriologia/aulaspraticas/tecnicasdesemeadura.htm>>. Acesso em: 4 de junho de 2016.

Vazoller, r. F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas. 1995. 259 f. Tese (doutorado em engenharia hidráulica e saneamento) - escola de engenharia de são carlos, universidade de são paulo, são carlos.

Vicente, e. J.; apostila de aulas práticas de microbiologia. Usp – icm – disciplina microbiologia básica. 2007.

Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ ministério da saúde, secretaria de vigilância em saúde. – brasília: ministério da saúde, 2006.

World health organization. Mastitis causes and management. Geneva: world health organization; 2000.

Winn jr., w. Et al (eds.) Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: lippincott williams & wilkins, 2006.diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: lippincott williams & wilkins, 2006.

World health oragnization. World health report 1999 making a difference. Geneve, who, 1999.