

## OCORRÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* EM LEITE CRU E PASTEURIZADO COMERCIALIZADO EM CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

### Occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw and pasteurized milk traded in Curitiba, Paraná state, Brazil

Danielle Karen Narcizo<sup>1</sup>, Maíke Tais Maziero Montanhini<sup>1\*</sup>

#### RESUMO

*Campylobacter jejuni* é uma das bactérias mais envolvidas em surtos de origem alimentar em todo o mundo. A campilobacteriose é comumente associada ao consumo de carne de aves contaminadas, porém, existem relatos de vários surtos desta doença associados à ingestão de leite contaminado, em geral por falhas no processo de pasteurização, ou mesmo pelo consumo de leite cru. Objetivou-se avaliar a ocorrência de *C. jejuni* em amostras de leite cru ou pasteurizado, bem como avaliar diferentes metodologias de análise para detecção deste microrganismo. Foram analisadas 30 amostras de leite, sendo 15 amostras de leite cru e 15 amostras de leite pasteurizado, as quais foram adquiridas na região metropolitana de Curitiba-PR, entre setembro de 2012 e março de 2013. As amostras foram submetidas à contagem de *C. jejuni* por meio do método de plaqueamento direto e pesquisa após o enriquecimento seletivo. Em nenhuma das amostras de leite pasteurizado foi detectada a presença de *C. jejuni*, por nenhum método utilizado. Por meio do método de plaqueamento direto, foram identificadas duas amostras de leite cru contaminadas por *C. jejuni*, com contagens entre  $4,0 \times 10^1$  a  $1,65 \times 10^2$  UFC/mL. Pelo método de enriquecimento seletivo, *C. jejuni* foi detectado em quatro amostras de leite cru, indicando a maior eficiência do método qualitativo em função da recuperação de células injuriadas e, portanto, maior confiabilidade para detecção deste patógeno. A ocorrência de leite contaminado por *C. jejuni* constitui um alerta para orientação de medidas preventivas no controle e eliminação deste patógeno na cadeia de produção e beneficiamento do produto.

**Palavras-chave:** campilobacteriose; produto lácteo; doença transmitidas por alimentos.

---

1 Faculdade Evangélica do Paraná, Rua Padre Anchieta, 2770, 80730-000, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: maikemaziero@yahoo.com.br

\* Autor para correspondência.

**Recebido / Received:** 29/03/2014

**Aprovado / Approved:** 08/08/2014

## ABSTRACT

*Campylobacter jejuni* is one of the most bacteria that cause food-borne diseases worldwide. Campylobacteriosis is commonly associated with the consumption of poultry meat; however, several outbreaks of the disease have also been linked to the ingestion of milk, usually due to failures in the pasteurization or even by raw milk's consumption. This study aimed to evaluate the occurrence of *C. jejuni* in samples of raw or pasteurized milk, as well as evaluate different methodologies for analysis of this microorganism. Thirty milk samples were analyzed, 15 samples of raw milk and 15 samples of pasteurized milk, acquired in the metropolitan region of Curitiba, state of Paraná, Brazil, between September 2012 and March 2013. The samples were subjected to counting of *C. jejuni* by direct plating and to the research after selective enrichment. None of the pasteurized milk samples showed *C. jejuni* contamination through both evaluated methods. By the direct plating method, were identified the contamination in two samples of raw milk, which presented counts of  $4,0 \times 10^1$  and  $1,65 \times 10^2$  CFU/mL. By using the selective enrichment method, *C. jejuni* was detected in four samples of raw milk, indicating the higher efficiency of the qualitative method in recovering injured cells and thus the higher reliability for detection of this pathogen. The occurrence of milk contaminated by *C. jejuni* should serve as a warning to guide preventive measures for the control and elimination of this pathogen in the production and manufacturing chain of the product.

**Keywords:** campylobacteriosis; dairy product; foodborne disease.

## INTRODUÇÃO

*Campylobacter jejuni* caracteriza-se como bastonete Gram negativo, curvo ou espiralado, não-esporogênico, oxidase positivo e negativo para urease. Apresenta arranjo em forma de "S", conhecido também como "asa de gaivota", e tem motilidade característica do tipo "saca-rolha" ou "vaivém". São bactérias microaerófilas, necessitam de baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de carbono para sua multiplicação. Utiliza os derivados da oxidação de aminoácidos como fonte de energia (BUTZLER, 1984; BASERISALEHI et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Essa bactéria constitui um dos principais agentes associados a doenças de origem alimentar em diversos países (ALLOS; BLASER, 1995; MEAD, 2004; TAYLOR et al., 2013). Nos Estados Unidos, mais de seis

mil casos de campilobacteriose são reportados anualmente ao Center for Disease Control – CDC, com uma estimativa de ocorrência de mais de 1,3 milhões de casos anuais, considerando os casos não reportados, o que corresponde à infecção de 1% da população do país (CDC, 2012). Ainda segundo o CDC, embora a doença seja autolimitante, ocorrem uma média de 750 óbitos por ano. Os principais sintomas associados são febre, náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (BASERISALEHI et al., 2006). Contudo, a campilobacteriose pode causar a síndrome de Guillain-Barré, uma doença neurológica autoimune que causa paralisia e pode afetar o músculo respiratório, levando à morte (BERG et al., 2014). A infecção pode ocorrer pela ingestão de menos de 500 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (ROBINSON, 1981; PARK, 2002).

A maioria dos casos de campilobacteriose é esporádica e os dados sobre surtos são

subnotificados. Apesar disso, grande parte dos surtos diagnosticados foi associada ao consumo de leite cru (CASTRODALE et al., 2013; LONGENBERGER et al., 2013; TAYLOR et al., 2013; ROBINSON et al., 2014). No entanto, no Brasil, são escassos os estudos epidemiológicos sobre este microrganismo. Há relato de um surto de infecção alimentar por *C. jejuni* associado ao consumo de leite cru, em que foram acometidos estudantes visitantes de uma fazenda produtora de leite tipo A, com morbidade de 58% entre aqueles que consumiram o produto. Os sinais clínicos relatados pelos pacientes infectados incluíam diarreia, febre e cólicas abdominais (SILVA et al., 1998).

Existem relatos de ocorrência de *C. jejuni* em leite e derivados em diversos países (DOYLE; ROMAN, 1982; ÖRMECI; ÖZDEMİR, 2007; RAHIMI et al., 2013). A mastite associada à *Campylobacter* spp. pode ser uma das causas de contaminação do leite cru, porém, a causa de contaminação do leite mais comum é o seu contato com fezes durante a ordenha dos animais em função de condições insatisfatórias de higiene (SILVA et al., 2007). *C. jejuni* é sensível ao processo de pasteurização, assim sua presença em leite pasteurizado é indicava de contaminação pós-pasteurização ou mesmo ineficiência do processo de pasteurização (ROBINSON, 1981; BASERISALEHI et al., 2006).

O estudo epidemiológico da campylobacteriose é prejudicado em função da dificuldade em identificar a presença do microrganismo em alimentos. O método de análise tem influência considerável sobre a recuperação de *C. jejuni* em alimentos considerando que, em condições adversas, as bactérias podem assumir a forma “viável, mas não cultivável” (VNC), a qual dificilmente é identificada por meio dos métodos convencionais de microbiologia (PARK, 2002). Contudo, a utilização conjunta de métodos de plaqueamento direto (quantita-

tivo) e enriquecimento seletivo (qualitativo) permite aumentar as chances de detecção deste microrganismo (MAZIERO; OLIVEIRA, 2010).

Considerando esta escassez de dados sobre a ocorrência de *C. jejuni* em produtos lácteos objetivou-se avaliar a ocorrência deste patógeno em amostras de leite cru ou pasteurizado, na região metropolitana de Curitiba-PR, por meio de dois métodos microbiológicos para a identificação desse micro-organismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 30 amostras de leite, 15 amostras de cru e 15 amostras de pasteurizado, adquiridas na região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná, entre setembro de 2012 e março de 2013. As amostras de leite pasteurizado foram aleatoriamente coletadas em diferentes pontos de venda e as amostras de leite cru foram coletadas diretamente em propriedades leiteiras e de comerciantes de leite cru.

As amostras foram imediatamente encaminhadas para o laboratório de microbiologia de alimentos e submetidas à contagem de *C. jejuni* pelo método de plaqueamento direto e à pesquisa de *C. jejuni* pelo método de enriquecimento seletivo, de acordo com as metodologias descritas por Franchin et al. (2005) e Maziero; Oliveira (2010).

Para a contagem de *C. jejuni* pelo método quantitativo, alíquotas de 0,2 mL de leite foram inoculadas em ágar Bolton modificado por Franchin et al. (2005), preparado com caldo Bolton (Himedia) adicionado de 1,5% de ágar-ágar (Himedia), 0,5 g/L de sulfato ferroso (J. T. Baker), 200 mg/L de solução de 2,3,5-cloreto-trifeniltetrazolium (TTC) (Sigma) e suplemento SR183E (Oxoid), contendo cefoperazone (10 mg/500 mL), vancomicina (10 mg/500 mL), trimetropim (10 mg/500 mL) e anfotericina B (5 mg/

500 mL). As placas foram incubadas por quatro horas a 37 °C, seguido de 44h a 42 °C, sob condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) com o emprego do sistema Microaerobac (Probac do Brasil). As colônias características de *Campylobacter* sp., ou seja, de cor magenta, lisas, pequenas, convexas e brilhantes e com bordas perfeitas, presentes em ágar Bolton modificado foram contadas e identificadas por meio de testes morfológicos (coloração de Gram) e bioquímicos (catalase, oxidase e hidrólise do hipurato) (SILVA et al., 2007).

Para a pesquisa qualitativa de *C. jejuni*, alíquotas de 10 mL de leite foram enriquecidas em 90 mL de caldo Bolton (Merck) e suplemento SR183E (Oxoid), como descrito anteriormente. O período de pré-enriquecimento foi de quatro horas a 37 °C,

seguido do enriquecimento de 44h a 42 °C, em microaerofilia. Após o enriquecimento seletivo as amostras foram estriadas com auxílio de uma alça de repicagem bacteriológica em ágar Bolton modificado, incubadas a 42 °C por 24h, também em microaerofilia. As colônias características foram submetidas aos testes morfológicos e bioquímicos descritos anteriormente.

Juntamente com as amostras foram conduzidas amostras intencionalmente contaminadas com estirpes de referência de *C. jejuni* para fins de controle das condições de análise.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de contagem e pesquisa de *C. jejuni* em leite cru e pasteu-

**Tabela 1** – Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em amostras de leite cru e pasteurizado adquiridas na região metropolitana de Curitiba-PR, entre setembro de 2012 e março de 2013, por métodos quantitativo (plaqueamento direto) e qualitativo (enriquecimento seletivo) (n=30)

Produto	Contagem de <i>C. jejuni</i> (UFC/mL)	Pesquisa de <i>C. jejuni</i> em 10 mL	Produto	Contagem de <i>C. jejuni</i> (UFC/mL)	Pesquisa de <i>C. jejuni</i> em 10 mL
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Presença	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Ausência	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	<5	Presença	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	40	Presença	Leite pasteurizado	<5	Ausência
Leite cru	165	Presença	Leite pasteurizado	<5	Ausência

rizado estão apresentados na Tabela 1. A bactéria foi recuperada em todas as amostras contaminadas intencionalmente o que indicou a eficiência das metodologias.

Em nenhuma das amostras de leite pasteurizado foi constatada a presença de *C. jejuni* tanto pelo método quantitativo quanto pelo qualitativo. Considerando que *C. jejuni* é inativada com a pasteurização, pode-se afirmar que o processamento térmico foi eficiente. Bactérias do gênero *Campylobacter* são mais sensíveis ao calor que outros patógenos Gram negativos, sendo em geral rapidamente inativadas em temperaturas superiores a 55 °C (BASERISALEHI et al., 2006).

Pelo método quantitativo a presença de *C. jejuni* foi constatada em 13,33% (2/15) das amostras de leite cru e a contagem variou de  $4,0 \times 10^1$  a  $1,65 \times 10^2$  UFC/mL (Tabela 1), enquanto o método qualitativo propiciou a detecção do patógeno em 26,7% (4/15) das amostras. Tendo em vista que a dose mínima infecciosa é de 500 células (PARK, 2002), este produto poderia representar um perigo à saúde do consumidor caso fosse consumido in natura ou utilizado na fabricação de derivados lácteos sem tratamento térmico adequado. Vale ressaltar que o consumo de leite cru é uma prática comum em diversas regiões do Brasil, o que pode veicular zoonoses além de outras doenças transmitidas por alimentos (CLAEYS et al., 2013).

Dois amostras apresentaram resultado positivo na prova qualitativa, porém no método quantitativo não houve crescimento de colônias visíveis. Apesar de prática e rápida, a técnica de contagem de *C. jejuni* por semeadura direta subestima a contaminação real de amostras submetidas a baixas temperaturas, uma vez que não recupera as células injuriadas (MAZIERO; OLIVEIRA, 2010). A não detecção de *C. jejuni* por meio do método quantitativo também pode ser associada ao número de células presente na amostra, abaixo do limite de detecção do método (<5 UFC/mL).

O método de enriquecimento seletivo em caldo Bolton promove o isolamento de *Campylobacter* sp. mesmo em baixas concentrações (WILLIAMS et al., 2009). As células VNC representam um perigo potencial à saúde pública, já que um lote poderia ser liberado pela não detecção do patógeno por métodos convencionais, apesar da sua presença no alimento (FORSYTHE, 2002). Alves e Oliveira (2013) utilizaram a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para a identificação molecular das colônias características de *Campylobacter* isoladas em ágar Bolton e constataram que todas as colônias isoladas foram confirmadas como sendo a espécie em questão. Esses dados ressaltam a eficiência do método em selecionar *Campylobacter* spp.

A ocorrência de *C. jejuni* em amostras de leite cru foi superior ao relatado em um estudo realizado da Universidade de Wisconsin-Madison, no qual *C. jejuni* foi isolada apenas em uma amostra de leite dentre 108 (0,9%), proveniente de tanques de nove fazendas de leite (DOYLE; ROMAN, 1982). Em outro estudo realizado na Turquia, *C. jejuni* foi isolada em 14 % das amostras de leite cru avaliadas, ressaltando o risco do consumo de leite cru (ÖRMECI; ÖZDEMIR, 2007). SILVA et al. (2008) detectaram *Campylobacter* spp. em 80% das amostras de queijo minas frescal comercializadas no município de Boicaúva-MG. RAHIMI et al. (2013) também relataram a ocorrência de *Campylobacter* spp. em queijo e manteiga, resultados que evidenciam a importância do controle deste microrganismo também em derivados lácteos.

Cerva et al. (2014) avaliaram 548 amostras de leite cru, provenientes de 125 fazendas leiteiras localizadas na região Sul do Brasil, com relação aos fatores de risco associados à contaminação bacteriana, utilizando para tanto, a técnica de identificação molecular Multiplex. *C. jejuni* foi o terceiro microrganismo mais frequente no estudo, sendo

*Salmonella* spp. e *Escherichia coli* os que apresentaram maior frequência de isolamento, nesta ordem.

Estes dados comprovam a importância da pasteurização e da conscientização da população quanto aos riscos do consumo de produtos lácteos produzidos com leite cru, principalmente por pessoas do grupo de risco: grávidas, crianças, imunodeprimidos e idosos (LONGENBERGER et al., 2013).

Até o presente, a análise de *C. jejuni* em alimentos ainda não é exigida pela legislação brasileira, apesar da relevância que este microrganismo apresenta para a saúde pública, somado às dificuldades de cultivo e o elevado custo dos materiais para a análise, limitam os estudos de sua ocorrência em alimentos em geral. Portanto, estudos como o presente, possuem grande relevância para o diagnóstico epidemiológico de *C. jejuni* em produtos lácteos produzidos no Brasil.

## CONCLUSÕES

A constatação de *C. jejuni* em amostras de leite cru indica a necessidade de orientar a implementação de medidas preventivas para o controle e eliminação deste patógeno na cadeia de produção do produto. Embora *C. jejuni* tenha sido detectado por meio dos métodos quantitativos e qualitativos, deve-se considerar a maior eficiência do método qualitativo, em função da sua maior sensibilidade e, portanto, maior confiabilidade para detecção deste patógeno. Embora legislação brasileira não tenha ainda estabelecido limites em alimentos, profissionais da indústria e de áreas afins devem considerar a relevância de *C. jejuni* em saúde pública, associada ao seu alto grau de envolvimento em doenças de origem alimentar em diversos países.

## REFERÊNCIAS

ALLOS, B. M.; BLASER, M. J. *Campylo-*

*bacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 1092-1099, 1995.

ALVES, J., OLIVEIRA, T. C. R. M. Presença de *Campylobacter* spp. em cortes refrigerados de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2829-2836, 2013.

BASERISALEHI, M.; BAHADOR, N.; KAPADNIS, B. P. *Campylobacter*: an emerging pathogen. **Research Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 23-37, 2006.

BERG, B. et al. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 8, p. 469-482, 2014.

BUTZLER, J. P. ***Campylobacter* infection in man and animals**. Florida: CRC Press, 1984. 246p.

CASTRODALE, L. J. et al. Sharing milk but not messages: campylobacteriosis associated with consumption of raw milk from a cow-share program in Alaska. **Journal of Food Protection**, v. 4, n. 5, p. 744-747, 2013.

CERVA, C. et al. Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, n. 5, p. 877-882, 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Foodborne diseases active surveillance network: report for 2011**. Atlanta: Center of Diseases Control and Prevention, 2012. 52p.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251-262, 2013.

DOYLE, M. P.; ROMAN, D. J. Prevalence

- and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1154-1158, 1982.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FRANCHIN, P. R. et al. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 157-162, 2005.
- LONGENBERGER, A. H. et al. *Campylobacter jejuni* infections associated with unpasteurized milk: multiple states, 2012. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 2, p. 263-266, 2013.
- MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T. C. R. M. D. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 501-505, 2010.
- MEAD, G. *Campylobacter* update: the challenge. **International Poultry Production**, v. 12, n. 4, p. 26-29, 2004.
- ÖRMECI, E., ÖZDEMİR, H. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in raw milk. **Milchwissenschaft – Milk Science International**, v. 62, n. 3, p. 264-265, 2007.
- PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.
- RAHIMI, E.; SEPEHRI, S.; MOMTAZ, H. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and dairy products in Iran. **Revue de Medicine Veterinaire**, v. 164, n. 5, p. 283-288, 2013.
- ROBINSON, D. A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. **British Medical Journal**, v. 282, n. 16, p. 1584, 1981.
- ROBINSON, T. J.; SCHEFTEL, J. M.; SMITH, K. E. Raw milk consumption among patients with non-outbreak-related enteric infections, Minnesota, USA, 2001-2010. **Emergencial Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 38-44, 2014.
- SILVA, C. M. et al. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em queijo tipo “Minas frescal” comercializados no município de Bocaiúva-MG. In: ENCONTRO NORTE-MINEIRO DE BIÓLOGOS, 5., 2008, Montes Claros. **Anais...** Belo Horizonte: Conselho Regional de Biologia – 4ª Região, 2008. p. 147.
- SILVA, M. R. et al. Investigação epidemiológica de um surto de toxinfecção alimentar por *Campylobacter jejuni* em estudantes de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 4., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: ABRASCO, 1998. p. 249.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007. 536p.
- TAYLOR, E. V. et al. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 5, p. 987-996, 2013.
- WILLIAMS, L. K. et al. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp.: effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, 31, p. 131-134, 2009.