

***Campylobacter* NO AMBIENTE DE ORDENHA E NO LEITE**

REBECA CAMARGO PORTO¹; DÉBORA SILVEIRA RODRIGUES²; KAUANA KAEFER³; HELENICE GONZALEZ DE LIMA⁴; NATACHA DEBONI CERESER⁵; CLÁUDIO DIAS TIMM⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas - rebecca_porto@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas - debora.rsilveira@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas - kauanakafer@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas - helenice@ufpel.edu.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas - natachacereser@yahoo.com.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas - timm@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento essencial para a população, estando a sua qualidade relacionada aos cuidados higiênicos e sanitários empregados durante a produção. A ordenha constitui etapa fundamental para a obtenção de leite de qualidade. Fatores relacionados à higiene dos equipamentos, dos manipuladores e do processo da ordenha podem levar à contaminação do leite, gerando risco à saúde pública (MIGUEL et al., 2012). Destaca-se como ferramenta na busca pela qualidade do leite, a identificação das principais fontes de contaminação do produto.

Campylobacter é o gênero bacteriano que causa maior número de casos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2011). *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies mais frequentes, encontrando-se disseminadas na natureza e no trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens. Os humanos infectam-se por contato direto com animais portadores, pela ingestão de carne crua ou mal processada de aves, suínos e bovinos ou, ainda, pela ingestão de leite não pasteurizado e água (de SÁ et al., 2007).

Além da infecção entérica, *C. jejuni* pode causar a síndrome de Guillain-Barré, uma enfermidade grave que cursa com paralisia neuromuscular aguda, cuja ocorrência é calculada em um para cada 1.000 casos de campilobacteriose (ALTEKRUSE et al., 1999). A transmissão da bactéria tem sido relacionada a leite e queijos (HUNT et al., 2009). A ocorrência de clones de *Campylobacter* em animais, alimentos e humanos tem sido reportada sugerindo que existe uma relação de transmissão entre eles ou que se contaminam a partir de uma mesma fonte (RAGIMBEAU et al., 2008; ZORMAN et al., 2006). No Brasil, entretanto, faltam estudos que permitam conhecer a dinâmica da epidemiologia da campilobacteriose na cadeia de lácteos, o que constitui a base indispensável para traçar planos efetivos de controle da enfermidade.

O objetivo do trabalho foi identificar a presença de *Campylobacter* no leite recém ordenhado e as possíveis fontes de contaminação relacionadas ao processo de ordenha.

2. METODOLOGIA

Para obtenção de amostras, foram realizadas 12 coletas em diferentes estabelecimentos rurais produtores de leite localizados na zona sul do Estado do Rio Grande do Sul.

Foram coletadas amostras da água utilizada na sala de ordenha, dos insufladores das ordenhadeiras mecânicas, da superfície interna dos baldes de leite

ou parede da tubulação, no caso de ordenhas canalizadas, das mãos dos manipuladores e do leite de conjunto. Também foram coletadas cinco amostras de fezes das vacas em produção.

As amostras das mãos dos manipuladores, dos equipamentos e dos utensílios foram coletadas antes do início da ordenha com uso de zaragatoas estéreis. Para as amostras das mãos dos ordenhadores, foi utilizada a técnica recomendada pela American Public Health Association (APHA, 2001). Para as amostras da superfície dos baldes, a zaragatoa foi friccionada em uma área de 100 cm² delimitada através de gabarito de aço inoxidável esterilizado (APHA, 2001). No caso de paredes de tubulação e insufladores, as zaragatoas foram friccionadas na parte interna, em todo diâmetro do tubo até um comprimento de 10 cm (MCDONALD et al., 1993). As amostras de fezes das vacas também foram obtidas com uso de zaragatoas diretamente do reto.

As amostras de água foram coletadas, com os devidos cuidados de assepsia, diretamente das torneiras. Após escoamento durante três minutos, o material foi depositado em frascos de vidro esterilizado, em quantidade aproximada de 400 mL, adicionado de 0,1 mL de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro. (APHA, 2001). Para as amostras de leite cru, foi realizada coleta diretamente do tanque de refrigeração após homogeneização. Com o auxílio de uma concha esterilizada, 200 mL foram retirados e acondicionados em frasco de vidro estéril (BRITO et al., 1998).

Após as coletas, as zaragatoas foram colocadas em caldo Brucella (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) contendo 0,4 % (m/v) de carvão ativado, 5 % (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio FBP (GEORGE et al., 1978) e 1 % (m/v) de suplemento *Campylobacter* I (Blaser – Wang) (Himedia), que contém antibióticos para controlar o crescimento da microbiota acompanhante. Todo o material coletado foi acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e imediatamente encaminhado ao laboratório. Os produtores cujos estabelecimentos participaram do trabalho, concordaram em assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que o estabelecimento fosse incluído.

Para isolamento, foi utilizada técnica descrita por SILVA et al. (2014). As colônias típicas, com brilho d'água e espreiadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. As colônias de bactérias com morfologia típica de bastonetes delgados, em forma de S ou asa de gaivota foram repicadas para novas placas e em seguida submetidas à extração de DNA para confirmação molecular.

Os DNAs para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram extraídos conforme recomendado por SAMBROOK e RUSSEL (2001). O DNA dos isolados foi analisado através da técnica de multiplex PCR descrita por HARMON et al., (1997), para diferenciação entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Os produtos de PCR, corados com GelRed™ (Uniscience, São Paulo, Brasil), foram visualizados em gel de agarose 1% (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha).

Após a identificação da espécie, foi feita a pesquisa de genes de virulência também através da técnica de multiplex PCR, de acordo com MARTINEZ et al. (2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 120 amostras dos 12 estabelecimentos visitados. Apenas no estabelecimento 8 o patógeno foi identificado. Foram obtidos isolados de

Campylobacter de três amostras de fezes de vacas, porém o microrganismo não foi encontrado no leite.

O isolado da vaca 1 foi identificado como *C. jejuni*, já os isolados das outras duas vacas foram classificados como *Campylobacter* spp., pois a confirmação molecular não foi possível devido à dificuldade de multiplicação do microrganismo em laboratório. O isolado da vaca 1 apresentava o gene *cdt*, portanto tem potencial para produção da toxina. O resultado é condizente com MARTINEZ et al. (2006), que demonstraram que a maioria das cepas de *C. jejuni* apresentam genes *cdt* e a maioria produz a toxina.

O fato de o animal estar contaminado facilita a disseminação no estabelecimento. Estudos epidemiológicos indicam que a higiene rigorosa reduz a transmissão de patógenos de animais aos alimentos por eles produzidos (ALTEKRUSE et al., 1999).

Evans et al. (1996) acompanharam casos de infecção gastrointestinal causada por *Campylobacter* em um grupo de crianças logo após visita e consumo de lanche em uma fazenda. As crianças consumiram leite cru possivelmente contaminado por fezes das próprias vacas leiteiras. Em duas outras visitas de outros grupos da mesma escola não houve relato de gastroenterite, mesmo elas tendo consumido leite cru. Os resultados demonstram que apesar de no dia da coleta não termos detectado a presença de *Campylobacter* no leite, há potencial de transmissão tanto das fezes das vacas para o leite, como para o ordenhador, caso as medidas higiênico-sanitárias não sejam adequadas.

Campylobacter não se multiplica em temperaturas abaixo de 30° C e é sensível a pH ácido. As medidas de controle incluem tratamento térmico, prevenção de contaminação cruzada, processos de higiene, entre outros. *C. jejuni* é rapidamente destruído quando cozido de 55 a 60°C por alguns minutos, e não forma esporos (FORSYTHE, 2013). Os principais mecanismos de controle são processos térmicos como a pasteurização. Sendo assim, leite e derivados crus, muitas vezes consumidos nos estabelecimentos rurais, geram grande preocupação em relação à campilobacteriose.

4. CONCLUSÕES

Campylobacter spp. pode ser encontrado em bovinos leiteiros em processo de ordenha. A presença deste patógeno no ambiente de obtenção do leite é um perigo que oferece risco de transmissão de *Campylobacter* via consumo do produto cru contaminado ou contato direto com as fezes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 28-35, 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION [APHA]. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, 2001, 4. Ed.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

EVANS, M. R.; ROBERTS, R. J.; RIBEIRO, C. D.; GARDNER, D.; KEMBREV, D. A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit. *Epidemiology and Infection*, v. 117, p. 457-462, 1996.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HUNT, D.C.; BAÑEZ, M.C.; NEISES D.; HANSEN G. *Campylobacter jejuni* infection associated with unpasteurized milk and cheese. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 51, p. 1377-1379, 2009.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E. et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.296, p.45-48, 2006.

MCDONALD, J.S; KINSER, M.L.; ADAMS, D.S. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine**, v. 88, n. 4, p. 382-386, 1993.

MIGUEL, P. R. R.; POZZA, M. S. S.; CARON, L. F.; ZAMBOM, M. A.; POZZA, P. C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012.

RAGIMBEAU, C.; SCHNEIDER, F.; LOSCH, S.; MESMO, J.; MOSSONG, J. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* from human, cattle and poultry origins in Luxembourg by multi-locus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and *fla*-short variable region (SVR) typing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7715-7722, 2008.

de SÁ, M. I. & FERREIRA, C. **Importância das zoonoses na segurança alimentar**. 2007. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-14-17.pdf>>. Acesso em 12 jun. 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; CUNHA, C.C.; LOPES, N.A.; AGOSTINETTO, A.; COLLARES, T.; LEON, P.M.M.; TIMM, C.D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 66, p. 297-304, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. *Campylobacter*. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/index.html>>. Acesso em: 18 set. 2013.

ZORMAN, T.; HEYNDRIX, M.; UZUNOVIĆ-KAMBEROVIĆ, S.; MOŽINA, S.S. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 24-33, 2006.