

Sobrevivência de *Campylobacter jejuni* em amostras de leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminados e mantidas sob refrigeração

Viability of *Campylobacter jejuni* in the refrigerated samples of artificially contaminated pasteurized and UHT milks

RIALA6/1663

Guilherme Paz MONTEIRO^{1*}, Roberta Torres de MELO^{1,2}, Priscila Christen NALEVAIKO^{1,2}, Eliane Pereira MENDONÇA^{1,2}, Belchiorina Beatriz FONSECA¹, Daise Aparecida ROSSI^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Rua Ceará s/n, Bloco 2D, sala 43, Bairro Umarama, Uberlândia, MG, Brasil. CEP: 38402-018, Tel: +55 34 3213-2319. E-mail: guil.paz@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

Recebido: 31.03.2015 - Aceito para publicação: 29.06.2015

RESUMO

Campylobacter é o agente etiológico mais prevalente em gastroenterites de causa alimentar no mundo. Apesar de o leite cru ser fonte de infecção, pouco se conhece sobre as consequências da recontaminação do leite. A viabilidade de *Campylobacter jejuni* foi avaliada em leites pasteurizados e UHT mantidos sob refrigeração. Ambos os leites foram divididos em cinco porções de 100 mL, inoculados com 10^1 UFC.mL⁻¹ de *C. jejuni* e mantidos de 4 °C a 7 °C por 48 horas. Repetiu-se o procedimento, utilizando-se inoculações de 10^2 , 10^3 e 10^4 UFC.mL⁻¹. As alíquotas foram analisadas imediatamente após inoculação e depois de 24 e 48 h quanto à viabilidade de *C. jejuni*. O micro-organismo manteve-se viável em todas as amostras, porém no leite pasteurizado houve redução de 1 ciclo log nas contagens após 24 h e baixas contagens após 48 h. Provavelmente, a redução ocorreu pela presença de microbiota neste leite, que competiu ou inibiu o crescimento de *C. jejuni*. O leite UHT ofereceu boas condições de sobrevivência em todos os períodos. O consumo de leite contaminado, mesmo em armazenamento refrigerado, pode ser fonte de infecção. O micro-organismo manteve-se mais viável no leite UHT quando comparado ao pasteurizado, provavelmente pela ausência de outros micro-organismos competidores.

Palavras-chave. *Campylobacter jejuni*, leite, contaminação experimental, viabilidade, baixa temperatura.

ABSTRACT

Campylobacter is the most prevalent etiologic agent of foodborne gastroenteritis worldwide. Although raw milk is an important source of infection, little is known about the consequences of milk recontamination. This study aimed at verifying the viability of *Campylobacter jejuni* in pasteurized and UHT milks stored under refrigeration. Both samples were divided into five portions of 100 mL, inoculated with 10^1 CFU.mL⁻¹ of *C. jejuni* and stored at 4 °C - 7 °C for 48 h. The procedure was repeated using inoculations of 10^2 , 10^3 and 10^4 CFU.mL⁻¹. Aliquots were analyzed immediately after inoculation and after 24 and 48 h to evaluate *C. jejuni* viability. The microorganism their viability in all of samples. In pasteurized milk a reduction of 1 log cycle occurred after 24 h and low counts after 48 h. Probably, the reduction happened due to the occurrence of microbiota in this milk, which caused competition or inhibition of microorganism growth. UHT milk offered good conditions for bacteria survival in all of the periods. The consumption of contaminated milk, even stored under refrigeration might be a source of infection. Microorganism were more viable in UHT milk than in pasteurized one, probably owing to the absence of competing microorganisms.

Keywords. *Campylobacter jejuni*, milk, experimental contamination, viability, low temperature.

INTRODUÇÃO

Campylobacter é atualmente o agente etiológico bacteriano mais envolvido nos casos de gastroenterite humana na Europa e nos Estados Unidos, sendo a espécie *C. jejuni* a mais prevalente. *Campylobacter jejuni* é a espécie mais associada aos casos de infecção humana, sendo o micro-organismo mais isolado de pacientes com intoxicação alimentar, excedendo cerca de três a quatro vezes outros patógenos entéricos como a *Salmonella* ou a *Escherichia coli*¹.

Segundo a Organização Mundial de Saúde², a campilobacteriose é uma zoonose, geralmente assintomática nos animais, mas que em humanos pode provocar gastroenterite com muco e sangue, febre, náuseas, além de dores de cabeça e musculares. Em alguns casos, podem gerar complicações consideradas raras, porém severas, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e outras neuropatias.

As aves seguidas dos suínos, realmente são os principais reservatórios das espécies de *Campylobacter*, no entanto sabe-se que não são as únicas fontes de infecção para os humanos, uma vez que os bovinos também são reservatórios importantes deste micro-organismo. Estes podem gerar uma via de contaminação para o leite, que quando ingeridos, podem ser potencialmente infectantes aos humanos³.

Há relatos de surtos associados à transmissão de *C. jejuni* pelo leite, tanto no Brasil quanto no exterior. No Brasil houve um surto associado ao consumo de leite não pasteurizado que infectou estudantes que visitaram uma fazenda produtora de leite no estado de Minas Gerais, resultando em 57,6 % de infectados entre os que consumiram o alimento⁴. Outro caso recente envolvendo infecção por *C. jejuni* pelo consumo de leite ocorreu no estado do Alaska, nos Estados Unidos, em 2013, no qual foram notificados 24 casos de campilobacteriose⁵.

O leite pasteurizado e o *Ultra High Temperature* (UHT), se beneficiados corretamente, devem estar livres de patógenos. No entanto, pode ocorrer recontaminação,

por meio de manipulação e armazenamento inadequados ou a partir do contato com outros alimentos ou fômites que podem ser vias de contaminação cruzada⁶.

Este experimento objetivou determinar a viabilidade de *C. jejuni* experimentalmente inoculada em leites pasteurizado e leite UHT após armazenamento sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU).

Quatro frascos contendo 100 mL de leite pasteurizado, retirados assepticamente de embalagens de leite de 1L, adquiridas no comércio local e provenientes de lotes diferentes, foram experimentalmente contaminados com *C. jejuni*. Utilizou-se para a inoculação, uma cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC (33291), que foi isolada de fezes humanas e é utilizada como cepa controle em pesquisas científicas. Devido a falta de estudos prévios de contaminação experimental ou natural na literatura (que cita somente o leite *in natura*), nos baseamos inicialmente na dose infectante de 500 células, aproximadamente 10^2 UFC/mL. Posteriormente, por tratar-se de um estudo inédito, e não conhecendo a sobrevivência desta espécie em refrigeração ou número de células que podem ser comumente possíveis de acontecer na contaminação pós-processamento, incluímos novas concentrações, padronizando quatro inoculos, que resultaram nas seguintes concentrações: 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 UFC/mL de leite, em seguida as amostras foram homogeneizadas e mantidas em refrigerador doméstico com temperatura variando entre 4-7 °C mensurada por termômetro digital (Prolab®) por até 48 h.

Alíquotas de 1 mL para a amostra não diluída e 0,1mL de suas respectivas diluições seriadas, foram amostradas imediatamente após inoculação (0 hora) e depois de 24 e 48 h para quantificação de *C. jejuni*. Paralelamente, foi utilizado um controle negativo

(sem inoculação).

Foram analisadas um total de 12 parcelas (1 variedade de leite x 4 inóculos x 3 tempos de análise) as análises foram feitas em triplicata, da qual foram calculadas as médias para obtenção do resultado para quantificação de *C. jejuni*. A estatística aplicada aos resultados foi descritiva, com o uso de médias e porcentagens. O mesmo experimento foi repetido utilizando leite UHT.

Preparo do inóculo de *Campylobacter jejuni*

Foi utilizada a cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 em segundo repique. A cepa liofilizada foi reativada em 10 mL de caldo Bolton (Oxoid®) incubado em condições de microaerofilia a 37 °C por 4 a 6 h e 41,5 °C por 44 ± 4 h. A cultura foi quantificada em PCR real time (Bax System®) e submetida a diluições decimais seriadas em 9 mL de água peptonada 0,1 % estéril até atingir a concentração desejada⁷.

Análises

As amostras de leite pasteurizado e UHT utilizadas no estudo foram avaliadas previamente quanto a possíveis interferentes para manutenção da viabilidade do micro-organismo inoculado, sendo eles: presença de resíduos de antibióticos beta lactâmicos e tetraciclina, quantificação de coliformes totais, termotolerantes, bactérias heterotróficas mesófilas, além do teste prévio de presença/ausência para *Campylobacter* spp.

A presença de resíduos de antibióticos betalactâmicos e de tetraciclina nos leites foi verificada com auxílio dos kits para ensaios imunoenzimáticos SNAP NBL (Idexx Lab.), com o intuito de garantir que o micro-organismo testado não sofresse morte ou inibição por ação de antibióticos. Esse kit é capaz de detectar os seguintes antibióticos (limite de detecção): Penicilina G (3 µg/Kg), Cefapirina (11,7 µg/Kg), Ceftiofur (12 µg/Kg), Ampicilina (5,8 µg/Kg), Amoxicilina (7,3 µg/Kg) e o Snap TETRA (Idexx Lab.): Clortetraciclina (100 µg/Kg), Oxitetraciclina (50 µg/Kg), Tetraciclina (50 µg/Kg). Estes são kits de resultado imediato, de visualização fácil e rápida, importante no caso desse experimento, para

saber das condições da amostra pré-inóculo. Os procedimentos foram realizados conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

O protocolo para análises de coliformes totais e termotolerantes foi realizado conforme descrito por Silva et al⁸, utilizando a técnica do NMP (Número Mais Provável) em tubos contendo 5 mL dos caldos Verde Brilhante Bile 2 % (Difco™) e caldo EC Medium (Difco™), respectivamente.

Para quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas, foi utilizada a técnica de inoculação de 1 mL da amostra pura e de suas diluições seriadas, em profundidade em Plate Count Agar (PCA) (Difco™)⁸.

Para garantir que os leites pasteurizado e UHT utilizados no estudo apresentavam ausência de *Campylobacter* spp., as amostras foram analisadas conforme protocolo descrito na ISO⁹ para presença/ausência em 25 mL.

A contagem de *Campylobacter* spp. foi realizada nas amostras dos dois tipos de leite inoculados experimentalmente, após 0, 24 e 48 h de armazenamento refrigerado a 4-7 °C (temperatura de armazenamento de alimentos).

O protocolo de análise utilizado foi conforme recomendações da ISO⁹.

Após diluição decimal seriada, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram distribuídas, com o auxílio da alça de Drigalski, em placas de m-CCDA (Oxoid®). Para a concentração de 10⁰ (amostra não diluída), 0,25 mL da amostra sem diluir foi distribuída em quatro placas do agar seletivo m-CCDA (Oxoid®), adicionado ao suplemento antibiótico (cefoperazone e anfotericina) (Oxoid®). A incubação foi realizada a 41,5° C por 44 ± 4 h em jarras para anaerobiose em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®).

Colônias com morfologia suspeita de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram contadas e confirmadas pelas provas de oxidase e morfologia típica de bastonetes curvos e espiralados ou em “asa de gaivota” na coloração de Gram modificada (uso da carboxifuccina substituindo a safranina).

Os resultados foram tabulados e

discutidos baseados em análise estatística descritiva, com utilização de médias e porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectados resíduos de antibióticos betalactâmicos e de tetraciclina ou presença de *Campylobacter* spp. em nenhuma das amostras de leite pasteurizado ou UHT utilizados para o estudo.

Em todas as amostras do leite UHT não houve crescimento dos micro-organismos bioindicadores. Esses resultados eram esperados, uma vez que o leite UHT é submetido à alta temperatura e embalado assepticamente, o que garante longa vida na prateleira, mesmo sem refrigeração.

Das quatro amostras de leite pasteurizado, uma delas (25 %) apresentou contagem para coliformes totais e quatro (100 %) para bactérias mesófilas, porém, dentro dos limites permitidos pela legislação que é de, no máximo 4,0 NMP.mL⁻¹ e 8,0 x 10⁴ UFC.mL⁻¹, respectivamente⁹.

As contagens médias (UFC.mL⁻¹) de *C. jejuni* nos leites imediatamente após a inoculação experimental e após armazenamento refrigerado por 24 h e 48 h estão na Tabela 1.

O número de células viáveis de

C. jejuni diminuiu ao longo do armazenamento refrigerado em ambos os tipos de leite. Porém, a redução no leite UHT foi discreta se comparada a do leite pasteurizado. No leite pasteurizado houve diminuição de aproximadamente 1 ciclo log nas primeiras 24 h e o número de células viáveis foi muito reduzido após 48 h de armazenamento.

O leite UHT ofereceu boas condições de sobrevivência ao micro-organismo inoculado. As contagens de *C. jejuni*, mesmo depois de 48 h em refrigerador se manteve em números próximos aos inoculados, não havendo redução logarítmica. A diminuição nas contagens de *C. jejuni* no leite pasteurizado ao longo do armazenamento corrobora com a hipótese de que a microbiota pré-existente no leite pasteurizado interferiu nos níveis de sobrevivência do micro-organismo inoculado, provavelmente, por competição ou inibição.

Segundo Hussain e colaboradores¹⁰, a principal forma de transmissão de *Campylobacter* spp. para humanos é por ingestão de alimentos contaminados. A contaminação do leite pode ocorrer no laticínio produtor após o beneficiamento, mas também pode acontecer nas residências, por meio da manipulação inadequada e contaminação cruzada, como o contato com outros alimentos contaminados ou fômites¹⁰.

Tabela 1. Contagens médias¹ de *C. jejuni* nos leites pasteurizado e UHT, inoculados e armazenados sob refrigeração (4 °C a 7 °C) por 0, 24 e 48 h

Inóculo (UFC.mL ⁻¹)	Tipo de leite	Tempo de armazenamento		
		0h	24h	48h
10 ⁴	Pasteurizado	2,3 x 10 ⁴ (+)	3,7 x 10 ³ (+)	3,0 x 10 ⁰ (-)
	UHT	8,2 x 10 ⁴ (+)	3,2 x 10 ⁴ (+)	7,3 x 10 ³ (+)
10 ³	Pasteurizado	2,3 x 10 ³ (+)	3,0 x 10 ² (-)	6,3 x 10 ⁰ (-)
	UHT	8,5 x 10 ³ (+)	6,9 x 10 ³ (+)	3,6 x 10 ³ (+)
10 ²	Pasteurizado	4,9 x 10 ² (+)	4,2 x 10 ¹ (-)	2,7 x 10 ⁰ (-)
	UHT	2,0 x 10 ³ (+)	2,2 x 10 ³ (+)	2,9 x 10 ³ (+)
10 ¹	Pasteurizado	9,2 x 10 ¹ (-)	4,0 x 10 ¹ (-)	1,3 x 10 ¹ (-)
	UHT	2,7 x 10 ² (-)	1,6 x 10 ² (-)	1,0 x 10 ² (-)

¹média de três repetições; (+): superior; (-): inferior à dose infectante de 4,0 a 5,0 x 10²

Existem na literatura relatos de campilobacteriose humana pelo consumo de alimentos contaminados de forma cruzada em cozinhas domésticas e comerciais. Em 1996, em um restaurante em Oklahoma, houve um surto de doença alimentar causado por *Campylobacter jejuni* pela ingestão de lanches que continham alface contaminada por esta bactéria oriunda de frangos crus. Isso enfatiza a necessidade de manter certos alimentos e utensílios de cozinha separados durante a manipulação e preparo da refeição¹¹.

A contaminação cruzada também é possível na manipulação e armazenamento doméstico inadequados de leite e outros alimentos a base de leite. Considerando os resultados obtidos neste estudo, a situação se torna de maior risco quando os alimentos são submetidos à cocção, eliminando a microbiota acompanhante, mas são posteriormente contaminados.

Chai e colaboradores¹² relataram que a contaminação de alimentos por *Campylobacter* pode ocorrer por meio das mãos, saliva, utensílios ou contato direto e indireto com outros alimentos. Assim, práticas de manipulação e higienização inadequadas podem aumentar a probabilidade de contaminação dos alimentos, e consequentemente, os casos de campilobacteriose humana.

De acordo com Hazeleger e colaboradores¹³, as espécies de *Campylobacter* classificadas como gastroentéricas são termotolerantes, com crescimento ótimo em temperaturas entre 37 °C a 42 °C, porém, sobrevivem por um longo período a 4 °C. Este fato foi comprovado em estudos precursores e também durante a realização deste experimento no leite UHT, no qual *C. jejuni* sobreviveu e se manteve em números relativamente constantes mesmo depois de 48 h quando armazenado em geladeira.

Pode-se inferir que a bactéria desenvolve estratégias que permitem sua sobrevivência, neste caso, o estresse à baixa temperatura. Garénaux e colaboradores¹⁴ mostraram que *Campylobacter* possui respostas de adaptação efetivas as situações de estresse que podem

permitir sua sobrevivência em condições adversas, como a variação da temperatura, como por exemplo, reduzindo sua dimensão celular e alterando sua morfologia típica de bacilos curvos para formas cocóides em período transitório, o que pode resultar nas formas viáveis não cultiváveis.

Além disso, o leite também possui propriedades crioprotetoras que auxiliam na sobrevivência do micro-organismo¹⁵. A autora demonstrou que o leite pode ser utilizado como crioprotetor em laboratório conservando *Campylobacter* em temperatura de congelamento e garantindo a manutenção de sua viabilidade por mais tempo, comparado ao método tradicional de conservação em glicerol. Sendo que esse efeito crioprotetor do leite pode ser devido à alteração na fluidez da membrana da célula ou pela contribuição do cálcio na estabilidade das enzimas celulares¹⁵.

Segundo a *Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food*¹⁶, a ingestão de 4,0 a 5,0 x 10² UFC do micro-organismo é o suficiente para gerar um quadro de infecção por *Campylobacter* spp. Assim, é possível inferir a partir dos resultados obtidos, que existem riscos de infecção alimentar por *C. jejuni* na situação experimental testada (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste estudo, aliado aos dados disponíveis na literatura, demonstram a importância da implementação de boas práticas de higiene na manipulação e armazenamento do leite pós-beneficiamento visando prevenir a sua contaminação e de outros alimentos por *C. jejuni*. Estes cuidados devem ser constantes também no ambiente doméstico.

O armazenamento de quaisquer embalagens de leite, sendo este pasteurizado ou UHT, deve ser realizado evitando a proximidade com outros alimentos de origem animal que possam estar contaminados com *Campylobacter* spp.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *C. jejuni* é capaz de sobreviver

em leite pasteurizado e UHT mantidos sob refrigeração por até 48 h. A viabilidade de *C. jejuni* foi maior no leite UHT, provavelmente devido à ausência de outros micro-organismos competidores e/ou inibidores nesta variedade, comparada ao leite pasteurizado que possui uma microbiota natural.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. European Food Safety Authority - EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *J EFSA*.2013;11: 3129 [250 p]. [DOI:10.2903/j.efsa.2013.3129].
2. World Health Organization - WHO. 2012. The global view of *Campylobacteriosis*. Utrecht, Netherlands, p. 9-11.
3. Esteves WTC, Ferreira AP, Siciliano S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do Rio São João, RJ, Brasil. *Cad Saúde Colet*.2011;19(1):74-81.
4. Silva MR. Investigação epidemiológica de um surto de infecção alimentar por *Campylobacter jejuni* associado ao consumo de leite cru [monografia]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2003.
5. Centro de Informações e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde - CIEVS. Informe Epidemiológico CIEVS Paraná – Eventos Semana Epidemiológica 10, 2013 [acesso 2015 Fev 13]. Disponível em: [http://www.sesa.pr.gov.br/arquivos/File/ACS/Informe10.pdf].
6. Gorman R, Bloomfield S, Adley CC. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int J Food Microbiol*.2002;76(1-2):143–50.
7. Users Guide BAX®System (2007) PCR assay with automated detection for bacterial screening. Du Pont Qualicon, Wilmington, DE.
8. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, 3ª Edição, São Paulo: Varela; 2007.
9. International Standards Organization - ISO. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO, 2006; ISO 10272-1.
10. Hussain I, Shahid Mahmood M, Akhtar M, Khan A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol*.2007;24(3):219-22. [DOI: 10.1016/j.fm.2006.06.001].
11. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food – Oklahoma. *MMWR Surveill Summ*.1998;47(7):129-31.
12. Chai LC, Robin T, Ragavan UM, Gunsalam JW, Bakar FA, Ghazali FM, et al. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. *Int J Food Microbiol*.2007;117(1):106-11.
13. Hazeleger W, Arkesteijn C, Tooropbouma A, Beumer R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. 1994;24(1/2):273-81.
14. Garénaux A, Jugiau F, Rama F, Jonge R, Denis M, Federighi M, et al. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol*.2008;56(4):293–7. [DOI: 10.1007/s00284-007-9082-8].
15. Moura MS. Influência de crioprotetores e pré-adaptação na viabilidade e produção de transcritos por cepas de *Campylobacter jejuni* mantidas a -20 °C [dissertação de mestrado]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
16. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food - ACMSE. Second Report on *Campylobacter*. 2005 [acesso 2014 Abr 16]. Disponível em: [http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf].