

Detecção de patógenos por PCR em DNA total de Queijos Minas Artesanal e Coalho feitos de leite cru

Barbara Ferraz Saraiva⁽¹⁾, Vitória Barbosa Conceição⁽²⁾, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽²⁾, Henrique Oliveira Frank⁽³⁾, Luciano Paulino Silva⁽⁵⁾, Márcio Roberto da Silva⁽⁴⁾, Karina N. C. Castro⁽⁴⁾ e João Batista Ribeiro⁽⁴⁾

⁽¹⁾Graduanda em Medicina Veterinária pela UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista de Iniciação Científica pela Fapemig na EMBRAPA Gado de Leite. E-mail: barbarasaraiva0@gmail.com, ⁽²⁾Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Leite e Derivados- UFJF, Juiz de Fora, MG, ⁽³⁾Apoio Técnico - Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, ⁽⁴⁾Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Resumo- O Queijo Minas Artesanal (QMA) e o Coalho artesanal são produzidos tradicionalmente com leite cru. Ainda que seja respeitado o tempo de maturação previsto na legislação, são necessários cuidados com a sanidade do gado, com o ambiente, com o atendimento à boas práticas de produção e fabricação, e com a verificação da segurança do produto final. Com esses cuidados as chances da presença de patógenos potencialmente perigosos aos humanos em queijos artesanais reduzem significativamente. Utilizou-se PCR para detectar *Campylobacter* spp. e *Coxiella burnetii* em DNA total extraído de 100 amostras de queijos artesanais provenientes de dois estados, Minas Gerais e Piauí. Esses patógenos causam nos humanos a Síndrome de Guillain-Barré e a Febre Q, respectivamente. Para a detecção do gênero *Campylobacter* foi utilizado primer específico para a região 16S rRNA, e para *C. burnetii* os primers tiveram como alvo a região IS1111. Não foram obtidos resultados comprobatórios para *Campylobacter*. Entretanto, 28 amostras de queijos artesanais foram positivas para DNA de *C. burnetii*.

Termos para indexação: *Campylobacter*, *Coxiella burnetii*, queijo artesanal, PCR, leite cru, zoonose.

Detection of pathogens by PCR in whole DNA of Minas Artisanal and Coalho cheese made from raw milk

Abstract- Minas Artisanal (MAC) and artisanal Coalho cheese are traditionally produced using raw milk. Even if the ripening time is met, care is needed with the health of the livestock, the environment, compliance with good production and manufacturing practices, and checking the safety of the final product. With these precautions, there is a significant reduction of the presence of hazardous pathogens to humans in artisanal cheeses. PCR was used to detect *Campylobacter* spp. and *Coxiella burnetii* in whole DNA extracted from 100 samples of artisanal cheeses from two states, Minas Gerais and Piauí. These pathogens cause Guillain-Barré Syndrome and Q Fever in humans, respectively. To detect the *Campylobacter* genus, a specific primer was used for the 16S rRNA region, and for *C. burnetii* the primers targeted the IS1111 region. No supporting results for *Campylobacter*

have yet been obtained. However, 28 artisanal cheese samples were positive for *C. burnetii* DNA.

Index terms: *Campylobacter*, *Coxiella burnetii*, Artisanal Cheese, raw milk, zoonosis.

Introdução

Os queijos artesanais produzidos no Brasil têm grande importância econômica, social e cultural nas regiões em que são produzidos. Por outro lado, o fato de serem produzidos com leite cru os torna um risco em potencial para a saúde pública. Isso se deve ao fato de que diversos microrganismos patogênicos, tais como *Campylobacter*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* podem ser encontrados nesse tipo de queijo e causar danos à saúde daqueles que o consomem.

Segundo o The European Food Safety Authority (EFSA), o consumo de leite cru e seus derivados é a segunda fonte mais comum de transmissão do *Campylobacter* para os humanos e este é um dos principais patógenos transmitidos por alimentos em todo o mundo (European Food Safety Authority, 2022). *Campylobacter* é uma bactéria patogênica que causa um quadro de gastroenterite e pode levar a sérias complicações como a síndrome de Guillain-Barré. Ainda que seja de grande importância zoonótica, a campilobacteriose ainda é subestimada em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil.

Por outro lado, *C. burnetii* tem distribuição mundial e causa uma importante zoonose chamada Febre Q. Essa afecção passou a ser mais estudada após um surto de grande magnitude na Holanda entre 2007 e 2010. Esse é um microrganismo extremamente resistente devido à sua capacidade de formar estruturas semelhantes a esporos; também devido a essa característica, é transmitida principalmente por aerossóis. A infecção de humanos ocorre principalmente via aerógena, mas a ingestão de leite e derivados também são fontes possíveis de contaminação.

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de *Campylobacter* e *C. burnetii* em queijo coalho e QMA, detectados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) aplicada em DNA total extraído de amostras de queijos, produzidos em quatro regiões de Minas Gerais e na região de Parnaíba, Piauí. Os resultados que a seguir são expostos vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, contribuindo para o alcance dos seguintes objetivos específicos: ODS 1 - Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares; ODS 2 - Erradicação da fome: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 3 - Saúde de qualidade: Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

Material e métodos

Para avaliar a prevalência e fatores associados a *Campylobacter* spp. e *C. burnetii* em queijos artesanais, 100 amostras de queijos artesanais foram selecionadas, sendo extraído o DNA total das mesmas por meio do método tradicional com uso de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, de acordo com Darwish et. al (2009), com algumas modificações. Em seguida, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo

Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, EUA). A PCR foi conduzida com o DNA extraído das amostras de queijo na concentração de 20 ng/μl.

As amostras foram coletadas no período de outubro de 2017 a abril de 2018, sendo 81 amostras de QMA provenientes de agroindústrias familiares rurais de processamento de queijos (AFR) registradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), de quatro regiões produtoras tradicionais do estado de Minas Gerais: Serro, Canastra, Triângulo, Cerrado. Nenhuma AFR do Piauí estava registrada no órgão sanitário estadual.

Para o ensaio da PCR convencional foram utilizados primers direcionados a região 16S rRNA, específicos para o gênero de *Campylobacter* spp. (Linton et al., 1997), e para região IS1111, específicos para *C. burnetii* (Mares-Guia et al., 2018). Por fim, os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Avaliamos possíveis tendências lineares por meio do teste do qui-quadrado entre as proporções das variáveis positividade para *C. burnetii* e tempo de cadastro de cada microrregião produtora no IMA*.

As AFRs foram georreferenciadas. A análise de estimativa de densidade do kernel (KDE) foi realizada para identificar clusters de AFR com queijos artesanais positivos para *C. burnetii*, e um mapa de varredura espacial (Scan) foi desenhado para identificar clusters espaciais com significância estatística. O processamento e análise dos dados foram realizados utilizando ArcGIS**.

Resultados e discussão

Durante o estudo não foi detectado *Campylobacter* spp. nos queijos analisados, entretanto novos experimentos serão realizados futuramente com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos ensaios.

No caso de *C. burnetii* foi detectado fragmento do gene IS1111 em 28 amostras de queijos artesanais. Além disso, houve uma diferença significativa na positividade entre as microrregiões produtoras ($p=0,04$): Serro (17%), Canastra (40,0%), Triângulo mineiro (20%), Cerrado (62,50%) e Piauí (36,84%). Adicionalmente, percebeu-se uma tendência linear significativa para positividade de *C. burnetii* em queijos artesanais produzidos nas regiões Serro, Canastra, Triângulo Mineiro, Cerrado e Piauí, conforme a ordem de cadastro em órgãos de fiscalização estaduais de MG (IMA), do mais antigo para o mais novo, estando os queijos do Piauí não cadastrados em qualquer órgão estadual (Figura 1.).

Ao analisar a distribuição espacial de AFR com queijos artesanais positivos para *C. burnetii* (Figura 2), verificou-se maior concentração de cluster nas microrregiões do Serro, Canastra e Cerrado. Atualmente, as três microrregiões possuem o maior número de estabelecimentos registrados no IMA e, conseqüentemente, maior representatividade em volume de produção. Este cenário sugere que o patógeno está entrando na cadeia de produção do leite por meio do rebanho leiteiro ou de contaminação ambiental, e que este patógeno está amplamente presente nos rebanhos bovinos leiteiros das respectivas regiões.

*Disponível em: <https://epitools.ausvet.com.au/trend>

**Disponível em: <http://www.arcgis.com/>

Esta alta positividade em queijos pode aumentar o risco de contaminação do consumidor via ingestão, uma vez que *C. burnetii* sobrevive em queijos artesanais submetidos a longos períodos de maturação. Além disso, esses resultados podem funcionar como indicador de possíveis contaminações ocupacionais humanas durante a própria fabricação do queijo artesanal.

Diante disso é importante desenvolver medidas de controle e prevenção mais rigorosas direcionadas à saúde animal, leite cru e em agroindústrias produtoras de queijos feitos de leite cru de modo a garantir a segurança deste alimento.

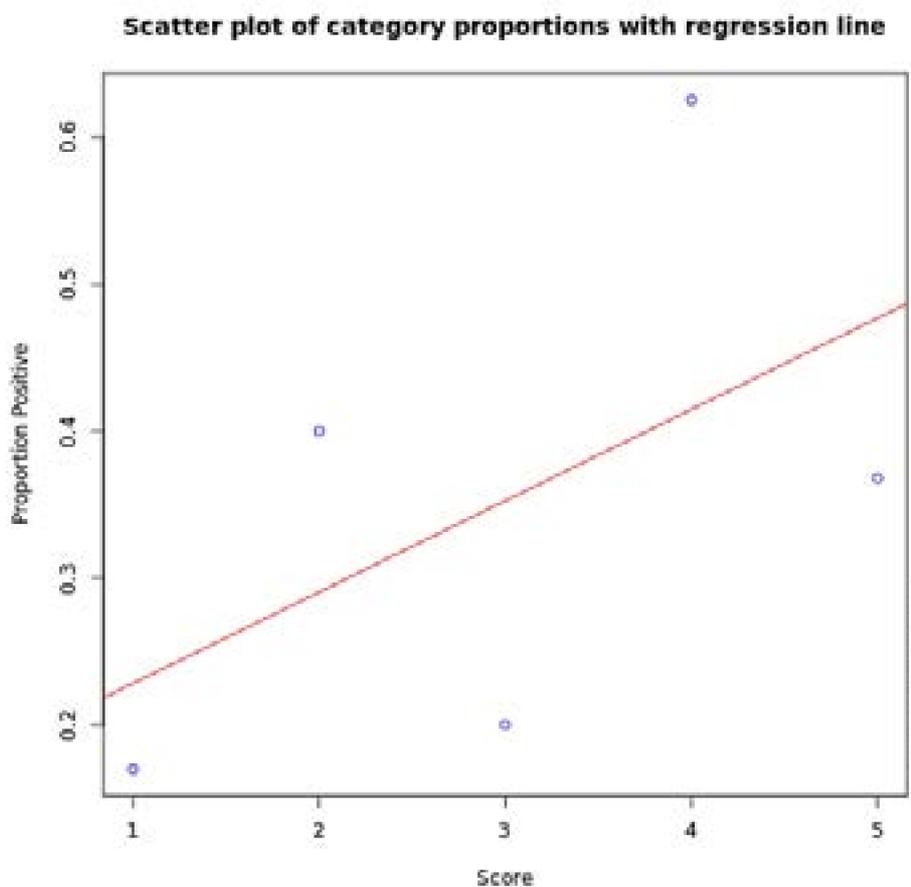


Figura 1. Tendências lineares crescentes de positividade de *C. burnetii* em queijos por ordem de cadastro em órgãos de fiscalização estaduais de MG (IMA), sendo os queijos do Piauí ainda não cadastrados em qualquer órgão estadual. Slope = 0,062 ($p = 0,025$), Qui-quadrado de Pearson = 9,88 (valor de $p = 0,04$). 1, Serro; 2, Triângulo; 3, Canastra; 4, Cerrado; 5, Piauí.

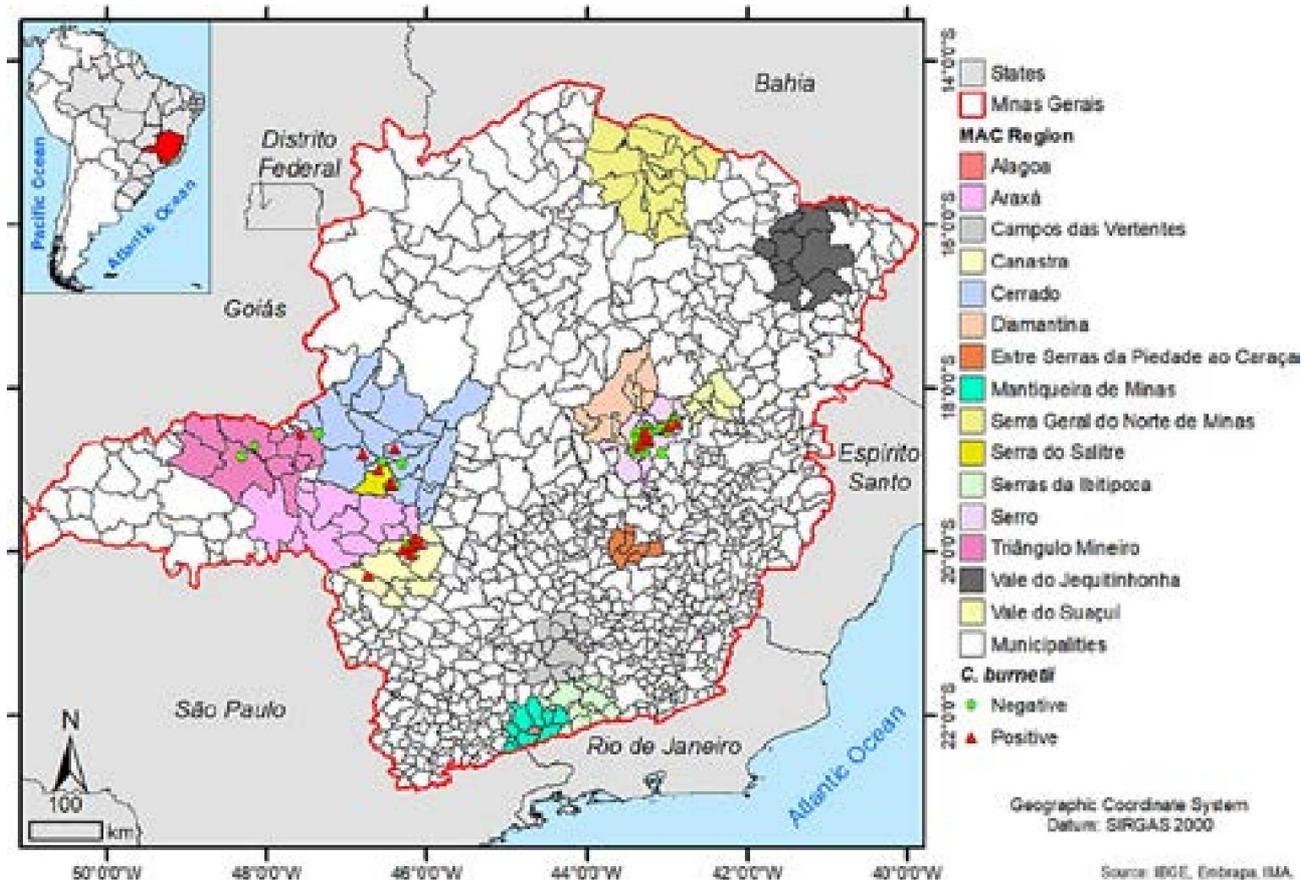


Figura 2. Distribuição espacial de agroindústrias familiares rurais de processamento de queijo Minas artesanal feito de leite cru. Positivo (triângulos vermelhos) e negativo (círculos verdes) para *Coxiella burnetii* em quatro regiões produtoras tradicionais, Minas Gerais, Brasil, 2018. Produzido com o software ArcGIS.

Conclusões

Embora os resultados não sejam conclusivos quanto a presença de *Campylobacter*, há evidências que indicam que este patógeno pode contaminar queijo de leite cru. Diante disso, são necessários estudos complementares para detecção de *Campylobacter* em queijos artesanais.

No caso do *C. burnetii*, os resultados indicam que há uma grande possibilidade da presença deste patógeno em queijos feitos de leite cru, uma vez que a PCR convencional foi suficiente para detectar seu DNA nas amostras, indicando também a possibilidade de o patógeno estar disseminado no rebanho leiteiro, nas agroindústrias e nos produtores, consequentemente, um potencial risco aos consumidores.

Agradecimentos

Trabalho realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

À Embrapa pela oportunidade, ao meu orientador Dr. Márcio Roberto, ao Dr. João Batista, ao Dr. Henrique Frank, mestrandas Vitória Barbosa e a todos que dividiram um pouco do seu conhecimento comigo durante a iniciação científica; com toda certeza foi uma experiência muito enriquecedora.

Referências

DARWISH, S. F.; ALLAM, H. A.; AMIN, A. S. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. **World Applied Science Journal**, v. 7, n. 4, p. 461-467, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union One Health 2021 zoonoses report. **EFSA Journal**, v. 20, n. 12, 7666, 2022.

LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2568-2672, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.10.2568-2572.1997>.

MARES-GUIA, M. A. M. M.; GUTERRES, A.; ROZENTAL, T.; FERREIRA, M. DOS S.; LEMOS, E. R. S. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 138-143, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.009>.