

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO**

**EFEITO DO ANTAGONISMO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E  
DA MATURAÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE *Brucella abortus* EM QUEIJOS  
TIPO MINAS ARTESANAL**

Jamili Maria Suhet Mussi

**Belo Horizonte  
UFMG-EV  
2018**

JAMILI MARIA SUHET MUSSI

**EFEITO DO ANTAGONISMO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E  
DA MATURAÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE *Brucella abortus* EM QUEIJOS  
TIPO MINAS ARTESANAL**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Medicina Veterinária.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva  
**Orientador:** Prof. Dr. Andrey Pereira Lage  
**Coorientadores:** Dr. Marcelo Resende de Souza  
Dr. Marcos Bryan Heinemann

**Belo Horizonte  
UFMG-EV  
2018**

Mussi, Jamili Maria Suhel 1986-

M417e Efeito do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láticas e da maturação na sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos tipo Minas artesanal / Jamili Maria Suhel Mussi. – 2018.

149 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Co-orientadores: Marcelo Resende de Souza, Marcos Bryan Heinemann

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Queijo-de-minas – Microbiologia – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido lático – Teses.  
3. *Brucella abortus* – Teses. 4. Segurança alimentar – Teses. I. Lage, Andrey Pereira.  
II. Souza, Marcelo Resende de. III. Heinemann, Marcos Bryan. IV. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.


CDD – 637.3

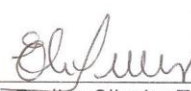
## FOLHA DE APROVAÇÃO

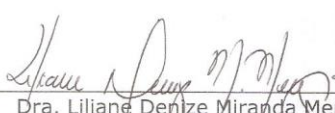
**JAMILI MARIA SUHET MUSSI**


Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 26 de Abril de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Andrey Pereira Lage  
Presidente – Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Evelise Oliveira Telles  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Liliane Denize Miranda Menezes  
Instituto Mineiro de Agropecuária

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jacques Robert Nicoli  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Escola de Veterinária - UFMG

*A família, que se dedicou por inteiro na minha formação moral e muitas vezes fez renúncias  
para eu ser quem sou*

Procure descobrir o seu caminho na vida.  
Ninguém é responsável por nosso destino, a não ser nós mesmos.

Chico Xavier

## AGRADECIMENTOS

Considero o doutorado uma jornada de superação ... da distância de casa e dos desafios por quase nada sair como planejado. Porém, muitos foram os que me auxiliaram e torceram para a concretização deste sonho, por isso agradeço...

A Deus por enviar anjos para meu auxílio a todo momento, me proporcionar oportunidades e me dar coragem para aproveitá-las.

A minha mãe, Maria da Penha, que com suas palavras de incentivo e conforto me fez superar os desafios com calma. Sua dedicação e exemplo me fizeram ser quem sou.

Ao meu pai, Nagib, que me ensinou a simplicidade da vida e que o amor está nos pequenos gestos.

Aos meus irmãos Amin e Salim pelos conselhos práticos, palavras de carinho e incentivo, momentos de diversão e sempre pensarem em formas de me ajudar.

A todos os familiares que torceram e me ajudaram de alguma forma. Em especial as minhas tias que sempre participaram de toda minha formação.

Ao Guilherme pelo amor e ajuda em cada passo, serei sempre grata por me ajudar a superar o tempo, a distância, a saudade, pelo auxílio nos experimentos, na escrita e me mostrar todos os dias o sentido da palavra companheirismo.

Aos amigos, velhos e novos, que deixaram tudo mais leve, com os momentos de descontração, desabafos, palavras de conforto e incentivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Andrey Pereira Lage, por me ensinar o quanto posso ser paciente e capaz de solucionar os problemas. Agradeço pelos incontáveis ensinamentos e principalmente pela confiança e oportunidades.

Ao meu co-orientador professor Dr. Marcelo Rezende de Souza por todo tempo desprendido para tirar milhares de dúvidas, auxílio e confiança.

Ao meu co-orientador professor Dr. Marcos Bryan pela disponibilidade de ajudar sempre, oportunidades e confiança.

A Dr. Elaine pela disponibilidade sempre e contribuir no planejamento dos experimentos.

A Dr. Luciana, pela amizade, ajuda e por acreditar na importância deste trabalho.

A equipe do LBA, em especial ao Jonata, Lucas, Ethiene e Damiana por contribuírem diretamente nos experimentos.

Aos demais professores, funcionários e alunos da EV-UFGM pelo carinho, respeito e auxílio quando necessário. Agradeço em especial ao técnico Eduardo Nunes Nogueira pelas brilhantes ideias e ajuda com o material do experimento.

Aos funcionários da FEPMVZ, em especial a Vanessa, que sempre esteve disponível para nos auxiliar nas compras.

A Juliana Mol e toda equipe do prof Renato Lima Santos pela disponibilidade e empatia.

A Jordana, Fernanda, Izabelle e Mariana, anjos de luz, pela ajuda na fase mais crítica dos trabalhos, com tanta boa vontade, carinho, dedicação e amizade. Vocês são demais!

Ao Dr. Pedro Motta por permitir a realização dos experimentos no Lanagro – MG e acreditar na importância deste trabalho para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro.

Ao Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior, por acompanhar as falhas e comemorações dos experimentos e acima de tudo, acreditar na qualidade técnica do meu trabalho. Sem sua motivação e crença acho que teria desistido.

Ao Dr. Paulo Martins pelo gosto pela pesquisa, discussões científicas, estímulo ao trabalho e principalmente pela confiança e oportunidade.

A Patrícia Gomes, Leandro Rezende, Marina Issa e Mikael Arrais pelos ensinamentos, conversas de motivação e amizade.

A Gracielle, Antônia, Mateus e todos os funcionários dos Laboratório de diagnóstico de doenças bacterianas, biologia molecular e controle de produtos biológicos pela inestimável paciência, colaboração e carinho.

Aos meus incontáveis amigos de carona ao longo destes anos, pelas viagens animadas para o Lanagro e disponibilidade em ajudar.

Me faltam palavras para agradecer a TODOS do Lanagro –MG pela contribuição, carinho, incentivo e ajuda diária, que possibilitaram a realização deste trabalho.

A Epamig, em especial a Cristiane Viana Guimarães Ladeira, por disponibilizar o leite para o experimento.

A Fundação Ezequiel Dias, em especial ao Dr Ricardo Souza Dias pela contribuição nas análises microbiológicas.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu da UFLA, aos técnicos e alunos de sua equipe, que gentilmente contribuíram com as análises físico-químicas.

Aos produtores João Dutra, Mariana e a Núbia por dividirem suas experiências da arte do queijo mineiro e disponibilizarem com tanta boa vontade o pingo para o experimento.

Aos professores da UFES, em especial ao Dr. Marcos Santos Zanini, Dr<sup>a</sup> Surama Freitas Zanini e Dr. Marcos Pinheiro Franque, por plantarem em mim o gosto pela pesquisa.

À Escola de Veterinária da UFMG pela formação profissional que me disponibilizou e ao CNPQ pela concessão da bolsa.

A Banca pelas sugestões e disponibilidade para avaliação deste trabalho.

Por fim, agradeço aos animais, amor maior e motivo da escolha da minha profissão.



---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE ABREVIACÕES .....	14
Resumo.....	15
Abstract .....	16
1. Introdução Geral.....	17
1.1. Referências .....	19
2. Objetivos .....	23
3. Capítulo 1: Queijo Minas artesanal: Produção, maturação e microbiota associada.....	24
3.1. Resumo.....	24
3.2. Abstract .....	24
3.3. Introdução .....	25
3.4. Queijos artesanais no Brasil .....	26
3.5. Queijo Minas artesanal.....	27
3.6. Qualidade do leite e queijo Minas artesanal.....	30
3.7. O processo de maturação dos queijos .....	32
3.8. Influência da maturação na sobrevivência de patógenos .....	36
3.9. Bactérias ácido-láticas em queijos e seus efeitos antagonistas contra patógenos .....	39
3.10. Considerações finais.....	41
3.11. Referências .....	42
4. Capítulo 2. Risco em saúde pública de <i>Brucella</i> spp. em leite e produtos lácteos.....	53
4.1. Resumo.....	53
4.2. Abstract .....	53
4.3. Introdução .....	54
4.4. Gênero <i>Brucella</i> spp.....	55
4.5. Histórico da brucelose humana via ingestão de leite e derivados .....	58
4.6. Epidemiologia da brucelose humana.....	60
4.7. Epidemiologia da brucelose animal .....	66
4.8. Excreção de <i>Brucella</i> spp. no leite .....	69
4.9. Viabilidade de <i>Brucella</i> spp. no leite e produtos lácteos.....	71
4.10. <i>Brucella</i> spp. no leite e em produtos lácteos em diferentes regiões do mundo .....	76
4.11. Conclusão .....	82

4.12. Referências .....	82
5. Capítulo 3: Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais contra <i>Brucella abortus</i> .....	101
5.1. Resumo.....	101
5.2. Abstract .....	101
5.3. Introdução .....	101
5.4. Material e métodos .....	102
5.4.1. Bactérias ácido-láticas e condições de cultivo .....	102
5.4.2. <i>Brucella abortus</i> e condições de cultivo .....	103
5.4.3. Teste do crescimento de <i>Brucella abortus</i> em diferentes meios de cultura .....	103
5.4.4. Ensaio de atividade antagonista de bactérias ácido-láticas contra <i>B. abortus</i> .....	104
5.4.4.1. Ensaio de antagonismo Spot-on-the-lawn.....	104
5.4.4.2. Ensaio de difusão em ágar.....	104
5.4.4.3. Ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas.....	105
5.5. Resultados .....	105
5.5.1 Teste do crescimento de <i>Brucella abortus</i> em diferentes meios de cultura .....	105
5.5.2. Ensaio de atividade antagonista de bactérias ácido-láticas contra <i>B. abortus</i> .....	105
5.5.2.1 Ensaio de antagonismo Spot-on-the-lawn.....	105
5.5.2.2 Ensaio de difusão em ágar.....	106
5.5.2.3 Ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas.....	107
5.6. Discussão.....	111
5.7. Conclusões .....	113
5.8. Referências.....	113
6. Capítulo 4. Efeito da maturação na sobrevivência de <i>Brucella abortus</i> em queijos “tipo Minas artesanal ” .....	118
6.1. Resumo.....	118
6.2. Abstract .....	118
6.3. Introdução .....	119
6.4. Material e métodos .....	120
6.4.1. Desenho experimental .....	120
6.4.2. Inóculos .....	120
6.4.3. Produção dos queijos “tipo Minas artesanal” .....	120

6.4.4. Detecção de <i>B. abortus</i> no leite, fermento endógeno, soro e queijos contaminados experimentalmente .....	122
6.4.5. Análises microbiológicas do leite, fermento endógeno e queijos controles .....	122
6.4.6. Análises físico-químicas do leite e queijos controles .....	123
6.4.7. Análises estatísticas .....	123
6.5. Resultados .....	124
6.5.1. Detecção de <i>B. abortus</i> no leite, soro e queijos contaminados experimentalmente	124
6.5.2. Análises da qualidade do leite cru e análises microbiológicas do fermento endógeno e queijos controles .....	129
6.5.3. Análises físico-químicas dos queijos controles .....	133
6.5.4. Correlação entre as variáveis microbiológicas e físico-químicas avaliadas nos queijos .....	135
6.6. Discussão .....	136
6.7. Conclusão .....	140
6.8. Referências .....	141
7. Considerações Finais .....	149

---

## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1. 1.</b> Parâmetros estabelecidos para análises físico-químicas do leite cru destinado a produção de queijo Minas artesanal .....	30
<b>Tabela 1. 2.</b> Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado a produção de queijo Minas artesanal .....	31
<b>Tabela 1. 3.</b> Parâmetros microbiológicos estabelecidos para queijo Minas artesanal .....	31
<b>Tabela 1. 4.</b> Espécies de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais das regiões da Serra da Canastra, de Araxá e de Campos das Vertentes e patógenos inibidos em teste de antagonismo in vitro.....	41

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 2. 1.</b> Espécies de <i>Brucella</i> spp. que causam doenças em seres humanos e animais, com os hospedeiros principais e ocasionais associados. ....	56
<b>Tabela 2. 2.</b> Surtos de brucelose humana associado com ingestão de leite e derivados lácteos contaminados.....	63
<b>Tabela 2. 3.</b> Sobrevivência de <i>Brucella</i> spp. em leite e derivados lácteos .....	72

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 3. 1.</b> Amostras de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal produzidos nas regiões da Serra da Canastra, Araxá e Campo das Vertentes usadas nos ensaios in vitro de atividade antimicrobiana contra <i>Brucella abortus</i> . ....	103
<b>Tabela 3. 2.</b> Concentração (UFC/mL) e pH do sobrenadante de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL), isoladas de queijo Minas artesanal usadas no ensaio de difusão em ágar contra <i>B. abortus</i> 544, 2308 e 2683, e <i>E. coli</i> ATCC 25922. ....	106
<b>Tabela 3. 3.</b> Concentração (UFC/mL) e pH do sobrenadante de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL), isoladas de queijo Minas artesanal usadas no ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas contra <i>B. abortus</i> 544, 2308 e 2683, e <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	107

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 4. 1.</b> Parâmetros microbiológicos e físico-químicos observados para o leite cru utilizado na fabricação dos queijos “tipo Minas artesanal”. ....	129
<b>Tabela 4. 2.</b> Parâmetros microbiológicos avaliados para o fermento endógeno .....	130
<b>Tabela 4. 3.</b> Coeficientes do modelo de regressão final utilizando-se o método “Generalized Estimating Equations” (GEE) para distribuição de Poisson, com estrutura de correlação autoregressiva (AR1) .....	136

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. 1.** Estados produtores de queijos artesanais no Brasil ..... 27  
**Figura 1. 2.** Regiões produtoras de queijos artesanais de Minas Gerais, Brasil..... 28  
**Figura 1. 3.** Bioquímica básica da maturação do queijo ..... 33

### CAPÍTULO 2

- Figura 2. 1.** Países com detecção de *Brucella* spp. em leite e derivados lácteos coletados no comércio ..... 77

### CAPÍTULO 3

- Figura 3. 1.** Ensaio spot-on-the-lawn de cultura de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus* ..... 106  
**Figura 3. 2.** Ensaio de difusão em ágar dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus* ..... 106  
**Figura 3. 3.** Efeito antagonista do sobrenadante e sobrenadante com pH 7,0 neutralizado de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus* 544, 2308 e 2683, e *E. coli* ATCC 25922 ..... 109  
**Figura 3. 4.** Ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus*. A, inibição total; B, inibição parcial; C, controle positivo. .... 110

### CAPÍTULO 4

- Figura 4. 1.** Fluxograma de produção do queijo “tipo Minas artesanal” ..... 121  
**Figura 4. 2.** Resultados da concentração de *B. abortus* no leite, soro e queijos “tipo Minas artesanal” no primeiro dia de maturação para os tratamentos  $10^3$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* no leite ..... 125  
**Figura 4. 3.** Resultados das contagens log UFC/g de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” em três repetições dos tratamentos controle,  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*,  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* nos 60 dias de maturação. .... 126  
**Figura 4. 4.** Resultados da análise de sobrevivência com percentual de redução de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” considerando os tratamentos  $10^3$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* ao longo da maturação. .... 127  
**Figura 4. 5.** Resultados da análise de sobrevivência com percentual de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” nos tratamentos controle,  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*,  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* ao longo da maturação. .... 128  
**Figura 4. 6.** Parâmetros microbiológicos avaliados nos queijos “tipo Minas artesanal” do tratamento controle ao longo da maturação. A: Bactérias ácido láticas; B: Bolores e Leveduras; C: Coliformes Totais; D= *Escherichia coli*; E= *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo; F= *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo ..... 132  
**Figura 4. 7.** Parâmetros físico-químicos avaliados nos queijos “tipo Minas artesanal” do tratamento controle ao longo da maturação. A: Percentual de umidade; B= Extrato seco; C=Percentual de proteína total; D= Percentual de gordura; E= Percentual de gordura no extrato seco; F= pH; G= Percentual de cloreto ..... 135

---

## LISTA DE ABREVIACÕES

---

°C	Graus centígrados
µL	microlitro
$a_w$	atividade de água
ATCC	American type culture collection
BAL	Bactérias ácido-láticas
BHI	Infusão cérebro – coração
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
iELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática indireto
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
g	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
L	Litro
LAB	Lactic acid bacteria
MLVA	Multilocus variable-number tandem-repeat analysis
MLST	Multilocus sequence typing
mL	Mililitro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
µm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMP	Número mais provável
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
pH	Potencial hidrogeniônico
OD	Densidade óptica
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	World Health Organization

## RESUMO

A brucelose possui importância mundial e a sua ocorrência na população humana está relacionada diretamente com a prevalência da doença em animais. No Brasil, *Brucella abortus* é endêmica em bovinos, com distribuição heterogênea entre os estados. A eliminação de *Brucella* spp. no leite de animais infectados possibilita que este alimento seja fonte de infecção para seres humanos. Além disso, *Brucella* spp. pode sobreviver em diversos produtos lácteos, incluindo queijos produzidos com leite cru que passam por período de maturação, mesmo que este processo ocasione alterações físico-químicas e microbiológicas no queijo, que contribui com a redução de patógenos. O queijo Minas artesanal é produzido com leite cru bovino e fermento natural endógeno e é maturado por período variável, dependendo da microrregião do estado de Minas Gerais em que é produzido. A presença de bactérias ácido-láticas (BAL) neste produto tem elevado a sua segurança alimentar, uma vez que estudos prévios demonstraram o potencial de BAL na inibição de patógenos de importância em saúde pública, por produção de substância antimicrobianas em teste *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, esta tese é composta de dois experimentos: o primeiro objetivou avaliar métodos para estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de BAL contra *B. abortus* e avaliar o seu efeito antagonista na viabilidade deste patógeno. O segundo experimento objetivou avaliar o efeito da maturação na sobrevivência de *B. abortus* em queijos “tipo Minas artesanal”. Para o primeiro experimento, 18 amostras de BAL isoladas de queijos Minas artesanais, de três regiões (Canastra, Campos das Vertentes e Araxá) do estado de Minas Gerais, Brasil, foram testadas contra três isolados de *B. abortus* (2308, 544 e 2683), por três metodologias: *spot-on-the-lawn*, ensaio de difusão em ágar e atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de BAL. Os resultados encontrados demonstraram que: apenas o ensaio de sobrenadantes de cultura de BAL possibilitou o estudo do antagonismo *in vitro* de BAL contra *B. abortus* e o crescimento de *B. abortus* foi totalmente inibido pela maioria das amostras testadas (13/18), exceto quando os sobrenadantes foram neutralizados (pH 7,0). O segundo experimento foi composto de três grupos experimentais:  $10^3$  UFC/mL *B. abortus*,  $10^6$  UFC/mL *B. abortus* e grupo controle negativo. *B. abortus* 2308 foi inoculada no leite nas concentrações determinadas por grupo experimental. Posteriormente 2% de fermento endógeno foi adicionado para confecção dos queijos, que foram maturados em BOD a 22,5°C e avaliados em 7 períodos de maturação (1, 8, 15, 22, 29, 45, 60 dias). A viabilidade de *B. abortus* foi determinada pelas técnicas de contagem pelo “drop counting method”, por plaqueamento direto de 1mL e pré enriquecimento. Os queijos do grupo controle negativo foram analisados quanto a contagem de coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo, BAL, bolores e leveduras, presença de *Salmonella* spp., percentagem de extrato seco total, umidade, gordura, proteína total, cloreto e pH. A redução da concentração de *B. abortus* durante a maturação foi avaliada por análise de sobrevivência e a influência das variáveis microbiológicas e físico-químicas na sobrevivência deste patógeno ao longo da maturação foi avaliada por regressão de Poisson utilizando “generalized estimating equations” (GEE). Os resultados encontrados para o tratamento com  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*, demonstram ausência do patógeno entre 8 e 15 dias de maturação. Já para o inóculo de  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus*, entre 22 e 29 dias de maturação foram necessários para inocuidade dos queijos Minas artesanais inoculados experimentalmente. A única variável no modelo que mostrou um efeito significativo na redução de *B. abortus* durante a maturação foi o tempo. Em conjunto estes dois experimentos mostram a importância das bactérias ácido-láticas e do processo de maturação na redução da viabilidade de *B. abortus*, contribuindo para inocuidade do queijo Minas artesanal.

**Palavras-chave:** Queijos, leite cru, microbiota do leite, brucelose, segurança alimentar, bactérias ácido-láticas, maturação

## ABSTRACT

Brucellosis has global importance and the occurrence in the human population is directly related to the prevalence of the disease in animals. In Brazil, *Brucella abortus* is endemic in cattle, with a heterogeneous distribution between the states. The shedding of *Brucella* spp. in the milk of infected animals makes this food a source of infection for humans. In addition, *Brucella* spp. can survive on various dairy products, including ripeness cheeses produced with raw milk, even if this process causes physical-chemical and microbiological alterations in cheese, which may lead to the reduction of pathogens. The Minas artisanal cheese is produced with bovine raw milk, endogenous starter culture and is matured for a variable period, depending on the micro-region of Minas Gerais state where it is produced. The presence of acid lactic bacteria (LAB) in this product has been increased its food safety, since previous studies have demonstrated the potential of LAB in the inhibition of pathogens of public health importance, by producing antimicrobial substance under *in vitro* and *in vivo* assays. Thus, this thesis is composed of two experiments: the first aimed to evaluate methods for *in vitro* study of the antimicrobial activity of LAB against *B. abortus* and to evaluate the antagonistic effect of LAB on viability of this pathogen. The second experiment aimed to evaluate the effect of maturation on the survival of *B. abortus* in Minas artisanal cheese. For the first experiment, 18 LAB strains isolated from Minas artisanal cheese from three regions (Canastra, Campos das Vertentes and Araxá), Minas Gerais, Brazil, were tested against three isolates of *B. abortus* (2308, 544 and 2683), using three methodologies: spot-on-the-lawn, agar well diffusion assay and antagonistic activity of the culture supernatants. The results showed that: only the acid lactic bacteria culture supernatants allowed the study of the *in vitro* antagonism of LAB against *B. abortus* and the *B. abortus* growth was totally inhibited by almost all LAB isolates tested (13/18), except when the supernatants were neutralized (pH 7.0). The second experiment was composed of three experimental groups:  $10^3$  CFU/mL *B. abortus*,  $10^6$  CFU/mL *B. abortus* and negative control group. *B. abortus* 2308 was inoculated in the milk at concentrations determined in experimental group. Subsequently, 2% of endogenous starter culture was added to the cheeses, which were matured in BOD at 22.5 °C and evaluated in 7 ripeness periods (1, 8, 15, 22, 29, 45, 60 days). The *B. abortus* viability was determined by techniques the counting of drop counting method, direct plating of 1mL and pre-enrichment. Cheeses from the negative control group were analyzed for coliform counts at 30 °C, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positive and negative, lactic acid bacteria, molds and yeasts, presence of *Salmonella* spp, percentage of total dry extract, moisture, fat, total protein, chloride and pH. A survival analysis was performed to evaluate the decrease of *B. abortus* concentration during ripening time. The influence of microbiological and physico-chemical variables on the survival of *B. abortus* in cheeses during ripening was evaluated by a Poisson regression using generalized estimating equations (GEE). The results found for treatment with  $10^3$  UFC/mL of *B. abortus*, demonstrated that between 8 and 15 days of ripeness, the pathogen was no longer detected. For  $10^6$  UFC/mL of *B. abortus*, between 22 and 29 days of ripeness were necessary for the innocuity of the Minas artisanal cheese experimentally inoculated. The percentage of moisture, fat in the dry extract and total protein in the cheeses were related to the survival of *B. abortus*. Together these two experiments demonstrated the importance of acid lactic bacteria and the ripeness process in reducing the viability of *B. abortus*, contributing to the food safety of the Minas artisanal cheese.

**Keywords:** Cheeses, raw milk, milk microbiota, brucellosis, food safety, acid lactic bacteria, ripeness.



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A brucelose é uma doença bacteriana crônica de grande importância para a pecuária (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Em bovinos a brucelose é principalmente causada por *Brucella abortus*, ocasionando prejuízos econômicos relacionados às perdas reprodutivas, como infertilidade e aborto no final da gestação e, perdas produtivas (ALVES et al., 2015).

Adicionalmente, aos prejuízos à produção pecuária, ainda é preciso considerar que a doença também tem uma grande importância em saúde pública. A brucelose é considerada segundo Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) uma das zoonoses mais importantes e difundidas no mundo (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006), com cerca de 500.000 casos de brucelose humana relatados anualmente (PAPPAS et al., 2006).

A ingestão de leite cru e produtos lácteos não pasteurizados é uma das principais formas de transmissão de *Brucella* spp. para seres humanos, a importância desta via de transmissão está diretamente relacionada aos casos da doença na população animal (MORENO, 2014). Além disso, a ocorrência de brucelose no homem também está associada ao contato direto ou indireto com produto do parto ou aborto de animais infectados (ALTEKRUSE et al., 1998).

No Brasil, a brucelose bovina causada por *B. abortus* é endêmica (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002; FERREIRA NETO et al., 2016). Visando ampliar o controle da doença no país e produzir alimentos mais seguros e de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2001). Dentre os objetivos do PNCEBT está a eliminação gradativa dos focos de brucelose e tuberculose, com abate sanitário de animais reagentes aos testes diagnósticos e certificação de propriedades livres. Para isso, medidas como vacinação de bezerras entre três e oito meses com vacina viva B19 ou de animais adultos com RB51, controle de trânsito animal com emissão de atestado negativo para brucelose e comprovação de vacinação ao serviço veterinário estadual semestralmente, são obrigatórias de serem realizadas pelo produtor, enquanto a certificação de estabelecimentos de criação livre de brucelose é uma medida de adesão voluntária (BRASIL, 2001; BRASIL, 2006).

Como forma de reduzir os riscos para saúde pública de doenças transmitidas ao homem por consumo de leite e seus derivados, incluindo brucelose, a pasteurização do leite foi implementada na indústria de alimentos, uma vez que o tratamento térmico elimina grande parte dos microrganismos patogênicos (DAVIES; CASEY, 1973). Porém, a legislação estadual de Minas Gerais, por meio da Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 e Portaria nº 1736 de 2017 (MINAS GERAIS, 2013, 2017) e a legislação Federal brasileira, por meio da portaria nº 146 de 7 de março de 1996 (BRASIL, 1996), permitem o uso de leite cru para a fabricação de queijos que passam pelo processo de maturação, incluindo aqui o queijo Minas artesanal, possibilitando a transmissão da *Brucella* spp. para seres humanos.

A produção artesanal de queijos no Brasil, por seu caráter informal, ao longo de sua história, se difundiu nas fazendas e pequenas propriedades rurais por todo território nacional, gerando produtos variados e muito apreciados pelos consumidores (MENEZES, 2011). Em Minas Gerais, o queijo artesanal é caracterizado por sua produção na queijaria da propriedade de origem do leite cru, segundo procedimentos próprios de tecnologia e produção, constituindo fonte de renda para as famílias que compõem a base da agricultura familiar e está atrelado às características socioculturais relativas ao modo de vida e trabalho dos produtores (MENESES, 2006; DORES;

FERREIRA, 2012). Desde 2008, o IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional) registrou o modo de produção artesanal do queijo Minas artesanal como patrimônio imaterial brasileiro (MINISTÉRIO DA CULTURA, 2000).

Além do uso do leite cru, o emprego de um fermento natural endógeno, denominado “pingo”, que é resultante da dessoragem dos queijos já salgados e coletado de um dia para o outro, confere características marcantes ao queijo Minas artesanal (MENESES, 2006). O “pingo” é composto por uma diversidade de microrganismos, incluindo culturas lácticas selecionadas, variável em cada região produtora, conferindo ao queijo sabor, coloração e olhaduras inerentes à tradição histórica e cultural da região do Estado em que foi produzido (NÓBREGA et al., 2008).

A qualidade do leite e demais matérias primas envolvidas na produção do queijo é fator primordial para a qualidade do produto final (DORES; FERREIRA, 2012). No entanto, publicações técnico-científicas sobre diagnósticos realizados nas propriedades produtoras de queijo Minas artesanal apontam para irregularidades e contaminação microbiana, inclusive por microrganismos patogênicos, tanto no leite cru e fermento endógeno quanto no queijo de algumas das propriedades, representando um desafio para saúde pública (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PINTO et al., 2009).

As propriedades produtoras de queijo Minas artesanal cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) devem realizar obrigatoriamente vacinação e testes diagnósticos periódicos para brucelose nos animais da propriedade (IMA, 2002). Desta forma, a obrigatoriedade de adoção destas medidas de controle da brucelose regulamentadas no PNCEBT e o maior número de propriedades certificadas como livres da doença, contribuem para a qualidade do queijo Minas artesanal e com a segurança do consumidor.

A regulamentação do uso do leite cru para a fabricação de queijos que passam por um processo de maturação (BRASIL, 1996; IMA, 2013), foi oriunda da legislação dos Estados Unidos, que implementaram em 1944, o período mínimo de 60 dias de maturação em temperaturas acima de 5°C para comercialização dos queijos produzidos com leite cru (FDA., 2015). Posteriormente, outros países do mundo passaram a adotar a mesma regra, por acreditarem que as alterações bioquímicas e microbiológicas, que ocasionam redução da umidade, queda do pH e aumento da concentração de cloreto de sódio no queijo durante a maturação levam a eliminação de possíveis patógenos presentes em queijos produzidos com leite cru (ZOTTOLA; SMITH, 1991; PERRY, 2004). Além disso, a riqueza em bactérias lácticas também tem sido associada a segurança destes alimentos, pela capacidade destes microrganismos de produzirem compostos de efeito antagonista conhecido contra patógenos de interesse em saúde pública (GÁLVEZ et al., 2010).

A redução do pH tem sido associada como principal fator com influência na sobrevivência de *Brucella* spp. em produtos lácteos (DAVIES; CASEY, 1973; EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990; ZÚÑIGA ESTRADA et al., 2005; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). No entanto, não se sabe qual a influência da ação de bactérias lácticas na sobrevivência deste patógeno. Além disso, *Brucella* spp. tem sido identificada no leite, queijos e outros produtos lácteos do mercado de diferentes regiões no mundo, incluindo no Brasil (KUPLULU; SARIMEHMETOGLU, 2004; MIYASHIRO et al., 2007; KARA; AKKAYA, 2013; WARETH et al., 2014) e a literatura sobre a inativação de *B. abortus* durante o processo de maturação do queijo é limitada, com sobrevivência variável de acordo com a variedade do produto, concentração inicial do microrganismo, temperatura de armazenamento, pH e atividade de água, podendo *Brucella* spp. sobreviver após o processo de maturação de 18 a mais de 60 dias, em

queijos Camembert, Parmesão, Cheddar, Limburguer e queijo tradicional de leite de cabra, e ainda ser recuperada do soro de leite (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946; PLOMMET et al., 1988; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; STARIKOFF et al., 2016). Mas, não se sabe qual o período de sobrevivência de *B. abortus* no queijo Minas artesanal.

As Portarias nº 1305, de 30 de abril de 2013 e nº 1736 de 2017, estabelecem diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, e define o período de maturação para a microrregião de Araxá de no mínimo 14 dias, do Serro em no mínimo de 17 dias e para as microrregiões da Serra da Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Salitre e Triângulo Mineiro em 22 dias (MINAS GERAIS, 2013, 2017). Já a portaria nº 146 de 7 de março de 1996 estabelece o período de 60 dias de maturação para os queijos elaborados com leite cru (BRASIL, 1996), sendo que as duas legislações requerem a realização de novas pesquisa para esclarecer o efeito da maturação na qualidade sanitária destes queijos.

### 1.1. REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 10, p. 1405–1407, 1998.

ALVES, A. J. S.; ROCHA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; ZYLBERSZTAJN, D.; DIAS, R. A. Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the States of São Paulo and Mato Grosso, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 118, n. 4, p. 351–358, 2015.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos - Portaria n. 146 de 07 de março de 1996*. Brasília, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal*. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2006.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. Brucellosis in humans and animals. *Geneva: World Health Organization*, p. 89, 2006.

DAVIES, G.; CASEY, A. The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *British Veterinary Journal*, v. 129, n. 4, p. 345–353, 1973.

DORES, M. T.; FERREIRA, L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: Ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 2, n. 2, p. 26–34, 2012.

EL-DAHER, N.; NA'WAS, T.; AL-QADERI, S. Effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 523–528, 1990.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Code of Federal Regulations*. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRsearch.cfm?CFRPart=133>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 142–148, 2010.

GILMAN, H. L.; DAHLBERG, A. C.; MARQUARDT, J. C. The Occurrence and Survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburger Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 29, n. 2, p. 71–85, 1946.

KARA, R.; AKKAYA, L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarajisar, Turkey. *British Journal of Dairy Sciences*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2013.

KUPLULU, O.; SARIMEHMETOGLU, B. Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. *Food Control*, v. 15, n. 7, p. 511–514, out. 2004.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F.; LÓPEZ-MERINO, A.; SUÁREZ-GÜEMES, F. *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 12, p. 1257–61, dez. 2011.

MENESES, J. N. C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil*. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 21 fev. 2016.

MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica de América Central*, v. XIII, n. Número Especial EGAL, p. 1–16, 2011.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 517, de 14 de junho de 2002 – Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal*. Belo Horizonte, 2002.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1305 de 30 de Abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal*, 2013.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1736 de 27/07/2017: Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal*, 2017.

MINISTÉRIO DA CULTURA. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Decreto nº 3.551, de 02 de outubro de 2000 - Institui o registro de bens culturais de natureza imaterial que constituem patrimônio cultural brasileiro, cria o Programa Nacional do Patrimônio Imaterial. *Brasília: Ministério da Cultura*, 2000.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase chain reaction ( PCR ). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 17–22, 2007.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–18, 2014.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. das; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. do C.; SANTOS, J. P. V. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal , fabricado na Serra da Canastra , Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”*, v. 363, n. 63, p. 26–30, 2008.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKIRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 293–300, 2004.

PINTO, M. S. P.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. a M.; PIRES, a C. S.; FONTES, L. B. a; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do serro, minas gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G.; COURAULT, M.; MUSSET, D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow’s milk. *Le Lait*, v. 68, n. 2, p. 115–120, 1988.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.

STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, P. H. F. da; PAULA, J. C. J. de; TELLES, E. O. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3743, 2016.

WARETH, G.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; NEUBAUER, H.; ROESLER, U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 10, p. 1339–1343, 2014.

ZOTTOLA, E. A.; SMITH, L. B. Pathogens in cheese. *Food Microbiology*, v. 8, p. 171–182, 1991.

ZÚÑIGA ESTRADA, A.; MOTA DE LA GARZA, L.; SÁNCHEZ MENDOZA, M.; SANTOS LÓPEZ, E. M.; FILARDO KERSTUPP, S.; LÓPEZ MERINO, A. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 47, n. 3-4, p. 88-91, 2005.

## **2. OBJETIVOS**

- 2.1. Avaliar diferentes métodos para o estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana e o efeito antagônico de bactérias ácido-láticas frente a *Brucella abortus*.
- 2.2. Avaliar o efeito da maturação sobre a sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos “tipo Minas artesanal” experimentalmente contaminados.

### 3. CAPÍTULO 1: QUEIJO MINAS ARTESANAL: PRODUÇÃO, MATURAÇÃO E MICROBIOTA ASSOCIADA

#### 3.1. RESUMO

O queijo é o produto lácteo mais produzido no mundo. Sua origem é de tempos remotos e sua produção foi estimulada por aumentar a conservação do leite. Ao longo do tempo, o queijo foi sendo adaptando aos gostos e culturas da população e, atualmente são conhecidos diferentes tipos de queijos. Os queijos artesanais são produzidos em diferentes estados do Brasil. No estado de Minas Gerais, o queijo Minas artesanal se destaca com produção em sete microrregiões (Araxá, Cerrado, Serra da Canastra, Serro, Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre). A produção do queijo Minas artesanal contribui com a geração de renda, principalmente para a agricultura familiar mineira, e está atrelado as características socioculturais relativas ao modo de vida dos produtores. O queijo Minas artesanal é produzido com leite cru e fermento endógeno como matérias-primas e possui metodologia de preparação própria. A riqueza em bactérias ácido-láticas (BAL) proveniente do leite, fermento endógeno, água e ambiente de produção do queijo contribuem para as características típicas do produto e além disso, estudos demonstram a capacidade dessas BAL antagonizarem patógenos de importância em saúde pública. A legislação exige parâmetros microbiológicos e físico-químicos para o leite cru e queijo Minas artesanal e que devem ser maturados entre 14 e 22 dias, dependendo da microrregião produtora no Estado, entretanto a legislação brasileira exige pelo menos 60 dias de maturação. As alterações microbiológicas e físico-químicas decorrentes do processo de maturação podem contribuir com a redução de patógenos, como diminuição do pH, aumento da concentração salina, e redução da atividade de água. A produção de queijo Minas artesanal vem se desenvolvendo com auxílio do programa queijo Minas artesanal, do IMA e EMATER, que contribui para o crescimento do setor, melhoria do preço dos queijos no mercado e melhor qualidade sanitária do produto oferecido ao consumidor. Apesar disso, muitos esforços ainda são necessários para redução do número de propriedades informais e comercialização do produto para outras regiões.

**Palavra-chave:** leite cru, queijos artesanais, bactérias ácido-láticas, maturação, qualidade sanitária

#### 3.2. ABSTRACT

Cheese is the most produced dairy product in the world. Its origin is of remote times and its production was stimulated by increasing the conservation of milk. Over time, the cheese was adapting to the tastes and cultures of the population, being current knowledge different types of cheeses. The artisanal cheeses are made in different Brazilian states. In Minas Gerais state, the Minas artisanal cheese stands out with production in seven micro-regions (Araxá, Cerrado, Serra da Canastra, Serro, Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro and Serra do Salitre). The Minas artisanal cheese production contributes with a generation of income, mainly for the family agriculture, and it is linked to socio-cultural characteristics of the producers. The Minas artisanal cheese is produced with raw milk and endogenous culture and have the own manufacturing method. Acid lactic bacteria from milk, endogenous culture and production environment contributed to the typical characteristics of the product and in addition, the studies demonstrated the possibility of antagonizing pathogens of importance in public health. The legislation requires microbiological and physical-chemical parameters for raw milk and artisanal cheese, and that cheeses should be taken ripening between 14 and 22 days, depending on the micro-region of the state, whereas Brazilian legislation demand at least 60 days of ripeness. The microbiological and



physical-chemical changes during the ripeness can contribute to the reduction of pathogens, reduction of pH, increase of saline concentration and reduction of water activity. The Minas Gerais artisanal cheese production has been developed with the aid of the program Minas artisanal cheese from IMA and EMATER, which contributes to the growth of the sector, improvement of market prices in the market and better sanitary quality of the product to the consumer. However, many efforts are still needed to reduce the number of informal properties and to commercialization of the product to other regions.

**Keywords:** raw milk, artisanal cheese, acid lactic bacteria, ripeness, sanitary quality

### 3.3. INTRODUÇÃO

O queijo é definido como um produto lácteo, fresco ou maturado, que se obtém por separação parcial do soro do leite, coagulado pela ação física do coalho, de enzimas e bactérias específicas ou de ácidos orgânicos isolados ou combinados, e pode ser consumido fresco, logo após a sua fabricação, ou maturado, quando passou por trocas bioquímicas e físicas necessárias para conferir características da variedade do queijo, e pode ser ainda adicionado de especiarias, condimentos ou aditivos (BRASIL, 1996).

A origem do queijo é de tempos remotos, há aproximadamente 7.500 anos a.C., quando o homem passou a domesticar animais e usar o leite de cabras e ovelhas (SUBBARAMAN, 2012). Achados arqueológicos em tumbas no antigo Egito já retratam a produção de queijos. Os gregos creditavam sua descoberta a Aristeu, rei da Arcádia, filho de Apolo e Cirene (PERRY, 2004). Alguns autores atribuem a descoberta do produto a uma lenda, de um nômade árabe, que em caminhada pelo deserto carregava leite em um cantil feito com estômago seco de um ovino, e observou que um líquido aquoso pálido e um amontoado de sólido branco de sabor agradável foi formado. Gregos e romanos aperfeiçoaram a produção do queijo, que passou a ser feito também com leite de outras espécies, como bovinos, equinos e asininos (IDFA, 2016).

Possivelmente, a produção de queijos foi estimulada por aumentar a conservação do leite, por ação da microbiota do leite ou adicionada a ele, principalmente bactérias ácido-láticas, que atuam no processo fermentativo e na maturação do produto, com produção de metabólitos, como ácidos, bacteriocinas e outras substâncias de efeito antagônico contra microrganismos deteriorantes e patogênicos (GÁLVEZ et al., 2010; ARQUÉS et al., 2015). Além disso, o queijo é um produto atrativo, por seu modo de produção possibilitar uma variedade de sabores e aromas, além de constituir um alimento nutritivo para o homem (WOUTERS et al., 2002).

Ao longo do tempo, o queijo foi adaptado aos gostos e culturas, que gerou uma multiplicidade de variações e alimentos produzidos com seu uso como matéria prima (EHLERS; HURT, 2008). Sugere-se que existem mais de 1000 variedades de queijo em todo mundo, com variações no teor de umidade, espécie animal de origem do leite, método de coagulação, temperatura de cozimento da massa, microbiota utilizada na fermentação, períodos de maturação e tipos de aditivos e condimentos adicionados (FOX; MCSWEENEY, 2004).

O queijo é o produto lácteo mais produzido no mundo. Em 2014, a produção global de queijo foi de mais de 22 milhões de toneladas (AHDB, 2018). Os maiores produtores mundiais de queijo foram os Estados Unidos, com 5,5 milhões de toneladas, mais de um quarto da produção mundial,

seguido de 2,7 milhões de toneladas produzidas pela Alemanha e 1,9 milhões pela França. O Brasil produziu 47 mil toneladas e está entre os dez maiores produtores mundiais (AHDB, 2018).

Com a propagação do consumo de queijo, o produto passou a ser apresentado em diferentes categorias, como queijos industriais, queijos finos ou especiais e queijos tradicionais ou artesanais, com diferentes modos de produção, distribuição e venda, além de consumidores diferenciados por renda e hábitos culturais (REZENDE; WILKINSON, 2005). Os queijos industriais são produzidos em maior parte com leite pasteurizado, de forma padronizada e em maior escala de produção. Os queijos finos possuem preço elevado, são produzidos pela indústria, mas podem apresentar algumas etapas artesanais. Já os queijos artesanais são produzidos em regiões específicas, na maioria das vezes com leite cru, de acordo com práticas culturais tradicionais, principalmente de modo familiar (CHALITA et al., 2009).

O objetivo desta revisão foi abordar a produção de queijos artesanais brasileiros, com ênfase no queijo Minas artesanal, no estado de Minas Gerais, demonstrando as peculiaridades e importância do produto.

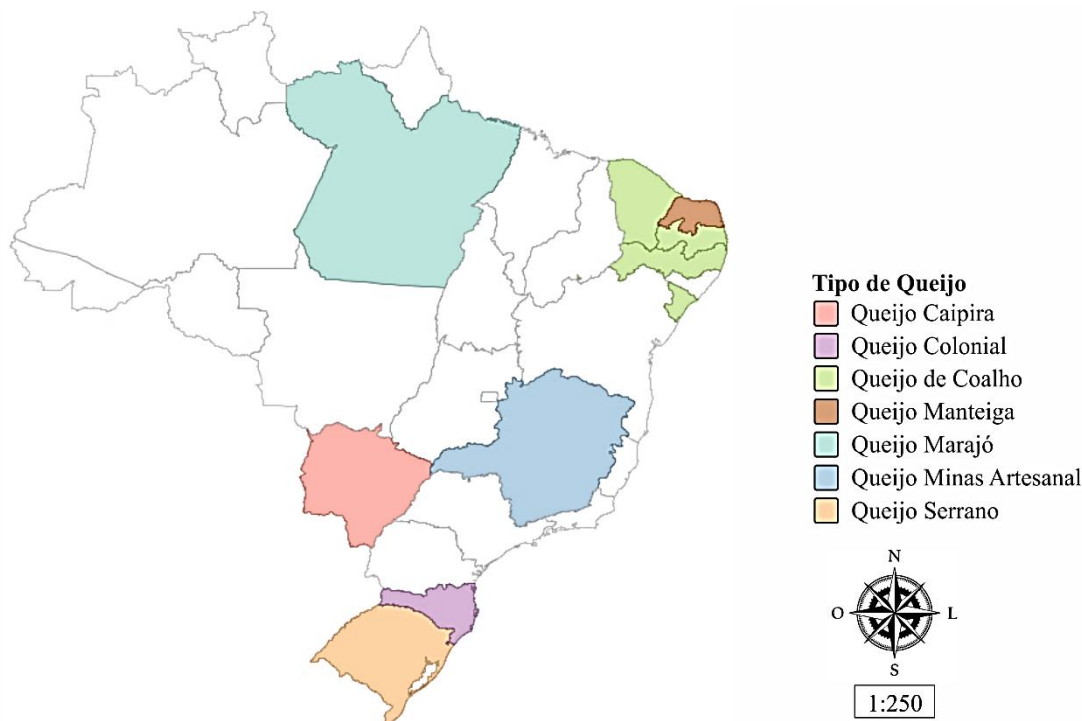
### **3.4. QUEIJOS ARTESANAIS NO BRASIL**

A produção de queijos artesanais no Brasil é realizada por pequenos produtores rurais, principalmente da agricultura familiar, que produzem pequeno volume de leite, utilizam a produção do queijo como uma forma de aumento da renda da propriedade e conseqüentemente melhor qualidade de vida para permanência das famílias no campo, principalmente por inserção destes agricultores nos mercados locais ou regionais (BÁNKUTI et al., 2017). A produção de queijos artesanais representa uma herança cultural e é resultado do conhecimento empírico acumulado e passado de geração a geração (ALICHANIDIS; POLYCHRONIADOU, 2008).

A produção de queijos artesanais no Brasil teve início no período colonial, influenciada pelos rebanhos bovinos trazidos pelos colonizadores portugueses, com elaboração de maneira semelhante ao queijo da Serra da Estrela, Portugal, tendo como única diferença o tipo de material utilizado para a coagulação e a espécie de origem do leite, sendo este produzido com leite de ovelha e coalho de origem vegetal. Outra vertente acredita que a origem seja do queijo de Açores, que é produzido com leite bovino e coalho animal (RIBEIRO, 1959). No Brasil, os queijos artesanais reconhecidos são produzidos com leite bovino e coalho de origem animal. A maior parte da produção artesanal de queijos no país possui caráter informal, que ao longo de sua história se difundiu nas fazendas e pequenas propriedades rurais por todo território brasileiro, gerando produtos variados e apreciados pelos consumidores (MENEZES, 2011).

Atualmente, são oficialmente reconhecidos os seguintes queijos artesanais no Brasil (Figura 1. 1): em Minas Gerais (MG), os queijos Minas artesanais produzidos nas microrregiões de Araxá (MINAS GERAIS, 2003a), Cerrado (MINAS GERAIS, 2007), Serra da Canastra (MINAS GERAIS, 2004b), Serro (MINAS GERAIS, 2003b), Campo das Vertentes (MINAS GERAIS, 2009), Triângulo Mineiro (MINAS GERAIS, 2014c) e Serra do Salitre (MINAS GERAIS, 2014a), o queijo Parmesão artesanal produzido nas microrregiões de Alagoa e do Vale do Suaçuí (MINAS GERAIS, 2014b, 2014d) e o queijo cabacinha do Vale do Jequitinhonha (MINAS GERAIS, 2004a); na região Nordeste, o queijo de Coalho e o queijo Manteiga (PERNAMBUCO, 2007; CEARÁ, 2016; RIO GRANDE DO NORTE, 2017; SERGIPE, 2018); na região Sul, os queijos Serrano e Colonial (RIO GRANDE DO SUL, 2016; SANTA CATARINA, 2018); no Mato Grosso do Sul, o queijo Caipira (MATO GROSSO DO SUL, 2004) e, no Pará, o queijo

Marajó (ADEPARÁ, 2013). No entanto, outros estados brasileiros produzem queijos artesanais e, buscam o reconhecimento e legalização de sua produção.



**Figura 1. 1.** Estados produtores de queijos artesanais no Brasil

### 3.5. QUEIJO MINAS ARTESANAL

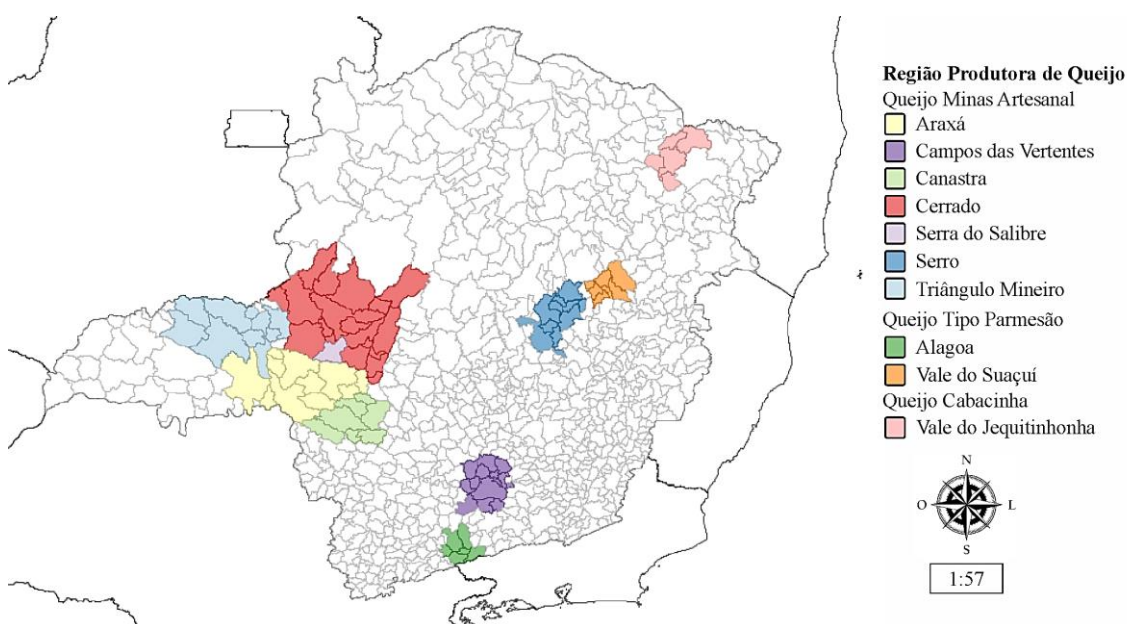
O queijo Minas artesanal é caracterizado pela produção na propriedade de origem do leite, em microrregiões do Estado de Minas Gerais, reconhecidas por sua produção tradicional, como mencionado anteriormente, por procedimentos próprios, sendo sua fabricação realizada com leite cru integral, em até 90 minutos após o começo da ordenha, com adição de fermento natural endógeno e coagulado com quimosina de bezerro, com posterior prensagem manual (MINAS GERAIS, 2002).

O queijo Minas artesanal gera renda para as famílias que compõem a base da agricultura familiar mineira, tendo grande importância econômica, com produtores que sobrevivem economicamente tendo por base essa atividade, e está atrelado as características socioculturais relativas ao modo de vida e trabalho dos produtores, com modo de fazer próprio na manipulação do leite cru recém obtido, da adição do pingo ou fermento endógeno, do coalho, da quebra e mexedura da massa, das formas de prensagem e da maturação (MENESES, 2006; DORES; FERREIRA, 2012). Desde 2008, o IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional) registrou o modo de produção artesanal do queijo Minas artesanal como patrimônio imaterial brasileiro (MINISTÉRIO DA CULTURA, 2000).

A produção de queijo está presente em mais de 600 dos 853 municípios de Minas Gerais, sendo que apenas as microrregiões do Serro, da Serra da Canastra, de Araxá, do Cerrado e do Campo das Vertentes, principais regiões produtoras do queijo Minas artesanal, produzem 29.005

toneladas / ano, envolvendo 9445 produtores e geração de mais de 25 mil empregos (DORES; FERREIRA, 2012).

Os queijos artesanais são produzidos em várias partes de Minas Gerais (Figura 1. 2). As diferentes microrregiões produtoras do estado foram delimitadas pela solicitação de produtores que necessitavam regularizar a comercialização do seu produto, levando a realização de estudos por parte da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER/MG) e da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), com objetivo de preservar a tradição histórica e o patrimônio cultural de cada área do Estado e agregar valor ao comércio do queijo (MINAS GERAIS, 2002). Para isto, foram realizados levantamentos históricos, agroecológicos, de condições de solo e clima das regiões do Cerrado, de Araxá, da Serra da Canastra e do Serro, demonstrando que cada região possui sua identidade com elaboração de queijos próprios (EMATER, 2018).



**Figura 1. 2.** Regiões produtoras de queijos artesanais de Minas Gerais, Brasil

Os queijos de cada uma das microrregiões do estado de Minas Gerais apresentam características sensoriais peculiares e distintas, com sabor brando a ligeiramente ácido, consistência de semi-dura a mais macia, odor mais forte ou mais sutil (EMATER, 2004). Estas características se devem a combinação de fatores como solo, pastagem, clima, altitude, água e raça do rebanho leiteiro das regiões produtoras, que possuem influencia na composição e na microbiota presente no leite (MENESES, 2006). Estas bactérias específicas, oriundas do leite cru, água, solo, fermento natural e ambiente de produção se multiplicam e dão aparência e sabor aos queijos de cada microrregião (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015).

Além do uso do leite cru, uma característica marcante do queijo Minas artesanal é o emprego de um fermento natural endógeno, denominado “pingo”. Esse fermento é resultante da dessoragem dos queijos já salgados e é coletado de um dia para o outro. O “pingo” é, portanto, um soro fermentado com certa quantidade de sal, que age como um iniciador da fermentação e confere ao queijo características típicas de sua variedade (MENESES, 2006). A composição do “pingo” é

característica de cada região produtora, possui grande variabilidade de microrganismos, como bactérias ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., além de bolores e leveduras (LIMA et al., 2009; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016). A ação da microbiota presente no queijo contribui com as características de consistência, sabor, coloração e olhaduras inerentes à tradição histórica e cultural da microrregião do Estado em que foi produzido (MACHADO et al., 2004; RESENDE et al., 2011).

O queijo Minas artesanal é prensado manualmente, sendo que algumas regiões produtoras, como a Serra da Canastra utilizam tecido para auxiliar neste processo (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013). Após enformados, os queijos são salgados na superfície com sal grosso de um dia para o outro e, após o processo de produção, são comercializados ainda frescos ou após maturação feita em prateleiras de madeiras a temperatura ambiente por período variável (PERRY, 2004; COSTA JÚNIOR et al., 2009).

Além das variações na composição físico-química e na microbiota do leite e do fermento natural endógeno em cada microrregião do estado de Minas Gerais, ocorre ainda distinção do queijo Minas artesanal entre propriedades. Pequenas modificações no modo de fazer caracteriza o queijo de cada produtor, como quantidade de fermento natural endógeno utilizado, o modo de quebra e mexedura da massa, o uso e tipo de tecido utilizado para auxiliar na prensagem, material das formas, quantidade de sal utilizado, o tempo e condições ambientais de maturação e, ainda, a composição da microbiota presente na bancada, utensílios e ambiente da queijaria e manipulador do queijo (MENESES, 2006).

Atualmente, existem cerca de 267 produtores cadastrados no programa do queijo Minas artesanal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), distribuídos em 7 microrregiões, sendo 13 produtores em Araxá, 4 em Campo das Vertentes, 48 na Serra da Canastra, 47 no Cerrado, 18 na Serra do Salitre, 123 no Serro, 9 no Triângulo Mineiro e 5 sem região definida, com propriedades situadas nos municípios de Água Boa, Angelândia, Guanhães, Santa Vitória e São João Evangelista (IMA, 2018).

Um outro avanço do programa do queijo Minas artesanal foi o registro no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA) de oito queijarias do Estado até 2018, provenientes das microrregiões Serra da Canastra, Araxá, Serro e de dois entrepostos relacionados, em que o selo da inspeção permite a comercialização do queijo para outros Estados brasileiros (IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA., 2018). Além disso, os produtores cadastrados vêm se organizando em forma de associações, o que contribui para comercialização e qualidade do produto, com maior valor agregado e investimento na capacitação dos produtores (APROCAME, 2018).

Podemos observar, de acordo com os dados anteriormente demonstrados, o baixo número de queijarias que podem comercializar legalmente o queijo mineiro dentro e para fora do Estado, o que tem levado, na maioria das vezes, ao comércio do produto de forma informal, inclusive para grandes mercados consumidores, como São Paulo e Rio de Janeiro, que faz com que o crescimento do setor seja prejudicado. Sabe-se que desde do início do processo de legalização do queijo Minas artesanal muito foi conquistado, com avanços crescentes no número de produtores cadastrados e na melhoria do valor agregado e qualidade do produto. Mas, apesar dos esforços realizados pelo IMA, EMATER e dos próprios produtores, na forma das associações, ainda assim é pequeno o número de queijarias registradas e a ausência de dados concretos sobre o número

total de produtores, quantidade e qualidade dos queijos produzidos permanece indefinido, dificultando maiores esforços para melhoria da cadeia produtiva do queijo.

Desta forma, o queijo mineiro em sua maioria é comercializado informalmente, sendo estimado que possam existir mais de 30 mil produtores de queijo artesanal em Minas Gerais, com produção de cerca de 50 mil toneladas ao ano (FONSECA, 2017). A ilegalidade do queijo reduz o valor de mercado do produto e ainda pode colocar em risco a saúde da população, pois estes produtores não seguem a legislação que regulamenta a produção. Além disso, muitos produtores não possuem a infraestrutura necessária e instruções para a adoção das boas práticas de fabricação e de medidas sanitárias no rebanho, essenciais para qualidade do queijo produzido.

### 3.6. QUALIDADE DO LEITE E QUEIJO MINAS ARTESANAL

A composição do leite propicia o crescimento de microrganismos benéficos, como bactérias ácido-láticas, que contribuem com sabor e conservação dos derivados lácteos e também para o crescimento de microrganismos indesejáveis, como patógenos para seres humanos e os que ocasionam deterioração e levam a perda da qualidade, com redução da vida útil do leite e derivados lácteos (OLIVER; JAYARAO; ALMEIDA, 2005). Na Tabela 1. 1 estão demonstrados os parâmetros físico-químicos exigidos para o leite cru para produção de queijo Minas artesanal.

A contaminação do leite pode ocorrer em várias etapas da cadeia produtiva, como pela presença de animais portadores de enfermidades no rebanho, por falhas higiênicas na ordenha com contaminação por fezes ou ainda por excreção direta via glândula mamária de microrganismos no leite (AULDIST; HUBBLE, 1998; MARÉCHAL et al., 2011). Além disso, manuseio sem higiene adequada, limpeza deficiente de equipamentos, instalações, falhas na distribuição e armazenamento também colocam em risco a qualidade sanitária do leite e dos produtos lácteos (DHANASHEKAR; AKKINEPALLI; NELLUTLA, 2012).

A adequação do leite aos parâmetros físico-químicos exigidos pela legislação é fundamental para garantir o alto valor nutricional deste alimento, a qualidade, sabor e também o rendimento dos derivados lácteos produzidos com esta matéria prima, sendo principalmente o alto teor de gordura e proteínas satisfatórios com a produção de queijos (MURPHY et al., 2016).

**Tabela 1. 1.** Parâmetros estabelecidos para análises físico-químicas do leite cru destinado a produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros Físico-químico	Critério de inspeção
Gordura (g/100g)	$\geq 3$
Proteína (g/100g)	$\geq 2,9$
Lactose (g/100g)	$\geq 4,3$
Extrato seco total (g/100g)	$\geq 11,5$
Extrato seco desengordurado (g/100g)	$\geq 8,5$

**Fonte:** (MINAS GERAIS, 2002; BRASIL, 2011).

A qualidade microbiológica do leite é indispensável para assegurar a saúde do consumidor e a qualidade dos queijos produzidos. A legislação estadual de Minas Gerais ressalta a necessidade do leite obtido para a produção de queijos artesanais ser proveniente de rebanho sadio, que não

apresente sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais para zoonoses, tais como brucelose e tuberculose, apresentem resultados negativos (MINAS GERAIS, 2012).

Os parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação estadual de Minas Gerais para o leite cru e queijo Minas artesanal são apresentados nas Tabela 1. 2 e Tabela 1. 3. Os produtores cadastrados no IMA devem enviar para laboratório cadastrado no órgão o produto para realização de exames laboratoriais de rotina, visando atestar a qualidade do produto final (MINAS GERAIS, 2006).

**Tabela 1. 2.** Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado a produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros microbiológicos	Critério de inspeção
Contagem bacteriana total (UFC/mL)	≤ 100.000
Contagem de células somáticas (Células/mL)	≤ 400.000
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	≤ 100
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	≤ 100
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp./ 25mL	Ausência
<i>Streptococcus</i> β- hemolíticos (Lancefield A, B, C, G e L) / 0,1 mL	Ausência

**Fonte:** (MINAS GERAIS, 2002; 2011).

Podemos observar baixos valores tolerados para a contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, aliadas a necessidade da ausência de *Salmonella* spp. e *Streptococcus* β- hemolíticos no leite (Tabela 1. 2).

**Tabela 1. 3.** Parâmetros microbiológicos estabelecidos para queijo Minas artesanal

Parâmetros microbiológicos	Critério de inspeção*			
	n	c	m	M
Pesquisa de coliformes 30°C (UFC/g)	5	2	1.000	5.000
Pesquisa de coliformes 45°C (UFC/g)	5	2	100	500
Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	5	2	100	1.000
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp./ 25g	5	0	0	-
Pesquisa de <i>Listeria</i> spp./ 25g	5	0	0	-

\*Plano de amostragem (n; c; m; M), segundo (BRASIL, 2001). Para amostra indicativa, sendo n = número de unidades amostrais, m= número de aceitação, M= limite máximo tolerado e c= número máximo aceitável de unidades amostrais que podem apresentar contagens microbianas acima do valor de m e abaixo do valor de M para o microrganismo investigado. **Fonte:** (MINAS GERAIS, 2002; 2008).

Para o queijo, são exigidas baixas contagens de coliformes a 30°C e 45°C e *Staphylococcus* coagulase positivo e ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. (Tabela 1. 3).

As análises microbiológicas exigidas na legislação são indicativas da qualidade do leite, saúde do rebanho, condições de higiene na ordenha, qualidade da água da propriedade, eficácia da limpeza e sanitização de equipamentos, limpeza do ambiente e também de condições de armazenamento e transporte do leite (ZUCALI et al., 2011). Além disso, são fundamentais para influenciar na qualidade, sabor e conservação dos queijos produzidos com esta matéria prima e para garantir a segurança alimentar dos consumidores (MARÉCHAL et al., 2011).

Vale ressaltar que a legislação vigente não contempla a pesquisa de *Brucella* spp. e *Mycobacterium bovis* em queijos Minas artesanais, agentes importantes em relação ao risco na saúde pública por consumo de leite cru e derivados. Apesar da exigência de exames negativos de brucelose e tuberculose em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal (MINAS GERAIS, 2012), apenas pequeno número, por volta de 38 propriedades, do estado de Minas Gerais são certificadas como livre dessas doenças (FERREIRA NETO et al., 2016), sendo que destas apenas uma é produtora de queijo Minas artesanal (Comunicação pessoal - IMA). Desta forma, é possível que a brucelose e tuberculose estejam presentes em propriedades produtoras de queijos Minas artesanais e a análise destes produtos possibilitaria uma melhor vigilância e controle destas enfermidades.

Vale lembrar que ainda são poucos os produtores de queijo cadastrados no IMA e grande parte dos queijos analisados em estudos realizados nas diferentes regiões produtoras não se enquadram na legislação vigente quanto a qualidade microbiológica, principalmente quando os queijos estão frescos, e ainda foi possível a detecção de microrganismos em contagens elevadas mesmo em queijos maturados (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PINTO et al., 2009; SALES, 2015; CASTRO et al., 2016).

As contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo foram de até  $10^6$  UFC/g, em queijos das regiões Serro, Serra da Canastra, Araxá e Campos das Vertentes e também no leite e pingo das propriedades (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PINTO et al., 2009; BORELLI et al., 2011; SALES, 2015; CASTRO et al., 2016). Em estudo realizado na região da Serra da Canastra as contagens de *Staphylococcus aureus* em queijos reduziram de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g até a ausência somente após 36 dias de maturação a  $25^\circ\text{C}$ , e os autores determinaram que período mínimo de 22 dias foi necessário para os queijos se adequarem aos padrões da legislação brasileira (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013). Em queijos do Serro, *Staphylococcus aureus* reduziram de  $10^4$  UFC/g até a ausência em 22 dias de maturação (MARTINS et al., 2015). Na região de Araxá as contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo foram de até  $10^6$  UFC/g no primeiro dia de produção e os queijos se enquadraram na legislação após 14 dias de maturação (SALES, 2015).

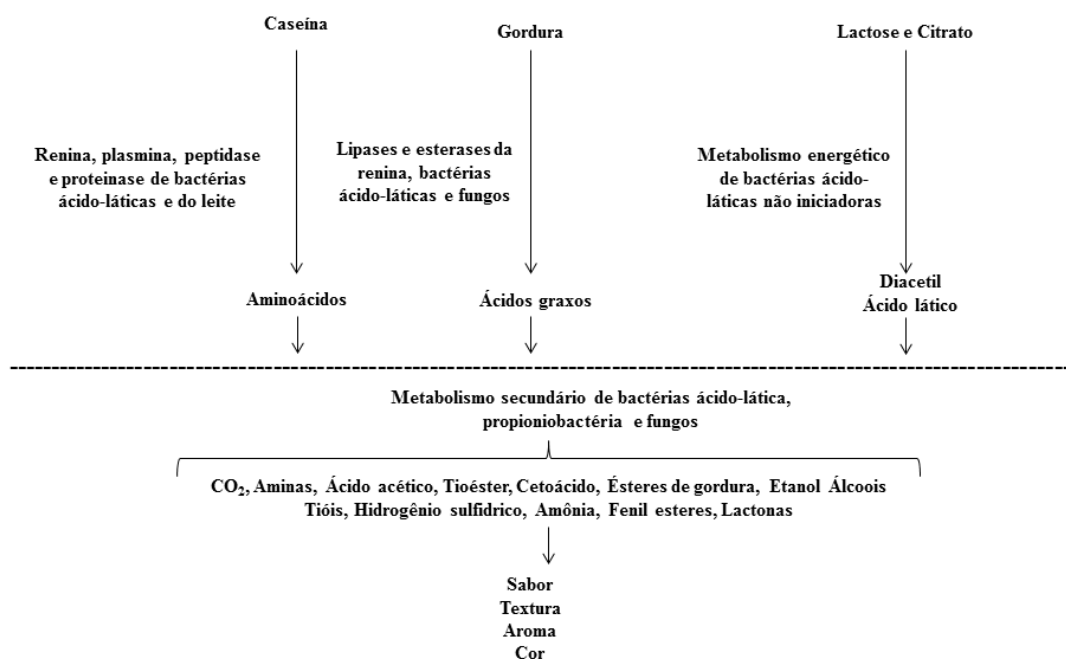
Em queijo do Serro, foram encontradas altas contagens de coliformes a  $30^\circ\text{C}$  e a  $45^\circ\text{C}$ , de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g e *Escherichia coli* de  $10^1$  a  $10^3$  UFC/g, mas *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* não foram detectadas (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PINTO et al., 2009). Em queijos da Serra da Canastra maturados a  $25^\circ\text{C}$ , as contagens de coliformes  $30^\circ\text{C}$  e *E. coli* reduziram de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g até a ausência em 36 dias, e período mínimo de 22 dias de maturação foi necessário para que os queijos se adequassem aos padrões da legislação brasileira (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013). Já em queijos do região do Serro, as contagens de coliformes a  $30^\circ\text{C}$  e *E. coli* passaram de  $10^3$  UFC a  $10^5$  UFC/g para valor próximo de  $10^1$  UFC/g no período de 17 dias de maturação (MARTINS et al., 2015). Em queijos de Araxá, contagens iniciais de *E. coli* foram de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g e foram necessários 14 dias para que os queijos se enquadrassem na legislação no que se refere à este parâmetro sanitário (SALES, 2015).

### 3.7. O PROCESSO DE MATURAÇÃO DOS QUEIJOS

A maturação é um fenômeno complexo, em que a microbiota do queijo metaboliza componentes como gordura, proteína e carboidratos, promovendo modificações bioquímicas, físicas e microbiológicas contínuas ao longo do período com desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do queijo (ARENAS et al., 2004).



As alterações bioquímicas, ocasionadas pela ação de enzimas, microrganismos e por condições como temperatura e umidade do ambiente no queijo durante a maturação, incluem primariamente o metabolismo de lactose e citrato, proteólise e lipólise e na sequência, eventos bioquímicos secundários, como catabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, diacetil e do ácido láctico (MCSWEENEY, 2004). As reações bioquímicas que ocorrem na maturação (Figura 1. 3) levam a liberação de metabólitos, como aminoácidos, ácidos graxos, diacetil, dióxido de carbono, tioésteres, cetoácidos, tióis, lactonas, ésteres de lipídeos, aminas, amônia, etanol e ácidos orgânicos como, o láctico, acético e propiônico, responsáveis pelas características do produto, como sabor, textura, cor e odor (LAW, 2001).



**Figura 1. 3.** Bioquímica básica da maturação do queijo

No decorrer da maturação, também ocorrem modificações microbiológicas no queijo, com predomínio de microrganismos iniciadores ou “starter” no início da maturação e, com avançar do processo, a redução da atividade de água ( $a_w$ ), aumento do teor de NaCl e a atividade hidrolítica das próprias enzimas microbianas, contribuem para o controle da atividade metabólica e multiplicação destes microrganismos iniciadores, para posteriormente ocorrer o crescimento da microbiota secundária (BERESFORD et al., 2001).

A origem da microbiota que compõe o queijo pode ser diversa, podendo ser oriunda da matéria prima como leite e fermento endógeno, de utensílios, do manipulador na confecção do produto, e

ainda do ambiente de produção e de maturação (BRUNO; CARVALHO, 2009). Dependendo da variedade do queijo é necessário na sua produção o conhecimento da espécie microbiana que deve ser adicionada de forma intencional ao produto para conferir suas características físico-químicas e sensoriais, como por exemplo a inoculação do fungo *Penicillium roqueforti* ao leite cru de ovelha para produção de queijo Roquefort, enquanto que em outros queijos, como no caso do queijo Minas artesanal, não se conhece com exatidão a composição do fermento endógeno, que é adicionado ao leite cru de vaca, podendo este ser composto de diferentes espécies de bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., bolores e leveduras e até mesmo microrganismos contaminantes que podem prejudicar a qualidade do produto, como *Staphylococcus* spp., coliformes, incluindo *E. coli* (NÓBREGA et al., 2008a; LIMA et al., 2009; CASTRO et al., 2016).

De forma geral, a microbiota das diversas variedades de queijos produzidos é composta de bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e fungos, com atuação em diferentes reações bioquímicas e fases da produção do queijo (BERESFORD et al., 2001).

Bactérias ácido-láticas iniciadoras de espécies variadas, dependendo do tipo de queijo, podem compor a microbiota do queijo, como por exemplo *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*, levando a produção de ácido láctico e redução do pH do queijo, para próximo de 5, e também contribuem na maturação por ação de suas enzimas em reações químicas, principalmente na proteólise e na lipólise (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Com o avançar da maturação e redução do pH, ocorre ação da microbiota secundária do queijo, como bactérias dos gêneros *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., algumas espécies de *Lactobacillus* spp., bactérias do ácido propiônico, *Enterococcus* spp. e fungos como *Penicillium* spp. (BERESFORD et al., 2001).

Em queijos nos quais se conhece a microbiota que deve ser adicionada ao leite na produção, as espécies microbianas são adicionadas intencionalmente, com função de produzirem substâncias que conferem aos queijos características específicas e desejáveis, como a produção de CO<sub>2</sub> para confecção das olhaduras e produção de propionato de etila e acetato com formação do sabor característico de acordo com a variedade (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001; BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

No caso do queijo Minas artesanal, produzido com fermento endógeno, não se conhece a composição da microbiota, e a característica do queijo de cada propriedade será consequência da presença de determinada espécie microbiana. Diferentes espécies de bactérias já foram identificadas no produto, como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. rivorum*, *E. raffinosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *Pediococcus acidilactici* (LIMA et al., 2009; RESENDE et al., 2011; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2017). Além disso, os fungos *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kodamaea ohmeri* e *Torulasporea delbrueckii* fazem parte da microbiota secundária, de importância na textura, sabor e aroma típicos dos queijos de algumas regiões de Minas Gerais (BORELLI et al., 2006a; NÓBREGA et al., 2008b; LIMA et al., 2009; PASSOS, 2017).

Na maturação do queijo, a formação de peptídeos, aminoácidos e amônia decorrentes da proteólise, por quebra da rede proteica que leva a alterações na textura e formação de novas ligações entre a água e grupos carboxila e amino, sendo que os compostos formados colaboram com a elevação do pH do queijo nas etapas mais tardias da maturação (SOUSA; ARDO;

MCSWEENEY, 2001). O consumo de ácido láctico pela microbiota secundária do queijo, principalmente fungos e dissociação de ácidos por bactérias também contribuem com essa alteração no pH dos queijos (LAW, 2001).

O processo de maturação é realizado em grande parte dos queijos comerciais em temperatura, umidade e velocidade do ar controlada, para aquisição das características organolépticas específicas e de forma padronizada antes do fornecimento ao consumidor (LAW, 2001). Porém, em variedades como o queijo Minas artesanal, a maturação é realizada em temperatura ambiente em estantes de plástico ou madeiras no próprio ambiente da queijaria, por períodos variados dependendo da preferências do mercado consumidor (PERRY, 2004).

O processo de maturação em temperatura maior que 5°C por período mínimo de 60 dias é regulamentado em muitos países como uma forma de garantia da qualidade sanitária de queijos produzidos com leite cru, como em queijos franceses (ex. Camembert), italianos (ex. Parmigiano, Reggiano e Pecorino Romano) e ingleses (ex. Cheddar) (PERRY, 2004; MENEZES, 2011). Este período mínimo de maturação tem como base a legislação dos EUA, onde é regulamentado desde 1949 (ZOTTOLA; SMITH, 1991). No Brasil, o período de 60 dias de maturação também é definido para os queijos elaborados com leite cru pela portaria nº 146 de 7 de março de 1996, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), sendo que a Instrução Normativa 30 de 2013 (BRASIL, 2013) e o Decreto 9.013 de 2017 (BRASIL, 2017) requerem a realização de novas pesquisa para esclarecer o efeito da maturação na qualidade sanitária dos queijos das diferentes regiões do país, possibilitando a redução deste período.

Parte dos produtores de queijo Minas artesanal consideram o período de 60 dias de maturação muito extenso, comprometendo a comercialização e descaracterizando o produto (DORES; FERREIRA, 2012). Alguns produtores ainda consideram o processo de maturação oneroso, por demandar instalações adequadas, atrasar a venda do produto e aumentar a responsabilidade do produtor em mantê-lo livre da contaminação por maior período (PERRY, 2004). Existe ainda um grande comércio do produto fresco, em descumprimento a legislação, pelo hábito de grande parte dos consumidores, que desconhecem os potenciais riscos do consumo do queijo fresco, e preferem o queijo com maior maciez e sabor sutil (PEREIRA, 2018).

A maturação do queijo Minas artesanal historicamente se deve as longas distâncias percorridas pelos queijeiros das propriedades ao centro consumidor, necessitando para isso de um produto mais firme, permitindo que os queijos fossem empilhados sem que deformasse no transporte. No entanto, a facilidade de locomoção nos tempos atuais fez com que o produto passasse a ser comercializado de duas formas, mais fresco ou maturado, dependendo da preferência do mercado consumidor (RATTON, 2011).

Não se sabe o percentual de queijo Minas artesanal fresco e maturado que é comercializado. No entanto, é certo que os dois produtos possuem diferentes mercados consumidores, tanto pelo gosto cultural quanto pelo preço de mercado. O queijo fresco pode ser encontrado com preços entre R\$ 10,00 e R\$ 15,00 reais o quilo, enquanto o queijo maturado pode ser vendido de R\$ 20,00 a R\$ 120,00 reais o Kg, ou ainda mais caro (REIS, 2017).

O maior preço de venda do queijo maturado ocorre em virtude das modificações físico-químicas e microbiológicas que acontecem ao longo do processo de maturação, com modificações nas características organolépticas do produto, o que agrega valor ao produto. Um grupo de produtores de queijo Minas artesanal atualmente encontraram um nicho de mercado crescente, que aprecia o

queijo maturado devido a maior intensidade de seu sabor, reconhecendo seu valor gastronômico, o que tem levado a maior receita para o produtor quando comercializa o queijo maturado por maior período (PEREIRA, 2015). Existem produtores com renda de 8 mil reais mensais, em virtude do crescente mercado consumidor dos queijos maturados (FAEMG, 2013). Alguns produtores relatam que o comércio do queijo maturado passou por esta expansão há uns 3 anos, e a maior demanda desse produto, está levando até a fila de espera pelo produto maturado, o que demonstra o potencial de crescimento deste mercado (REIS, 2017).

Atualmente, o mercado do queijo maturado vem estimulando a necessidade de novos estudos com fungos e ácaros que se desenvolvem em queijos Minas artesanais nas diferentes regiões produtoras, que tendem a impulsionar ainda mais o desenvolvimento do setor (CRUZ, 2017).

### 3.8. INFLUÊNCIA DA MATURAÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS

Os queijos constituem um meio adequado para o crescimento de muitos agentes patogênicos de origem alimentar, por serem produtos muito manipulados e passíveis de contaminação ao longo de todo processo produtivo, o que é agravado quando são produzidos com leite cru, uma vez que o tratamento térmico do leite, como pasteurização, elimina maior parte dos microrganismos do leite, o que reduz consideravelmente o risco da presença de patógenos nos queijos (BACHMANN; SPAHR, 1995; KOUSTA et al., 2010).

Diversos patógenos podem ser transmitidos ao homem por ingestão de queijos, como *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *B. abortus* e *B. melitensis* (BROOKS et al., 2012; YOON; LEE; CHOI, 2016). O consumo de queijo fresco tem sido associado a doenças em seres humanos em várias partes do mundo e em consequência disto, a maturação é tida como uma forma de contribuir com a qualidade sanitária deste produto (ZOTTOLA; SMITH, 1991).

Apesar do conhecimento de que a maturação resulta em maior segurança sanitária para os queijos produzidos com leite cru, não haviam estudos específicos para determinação do período necessário em queijos Minas artesanais. Na busca da legalização deste produto pesquisas foram conduzidas para conhecer as características físico-químicas e microbiológicas dos queijos comercializados nas microrregiões do Serro (MARTINS et al., 2015) e da Serra da Canastra (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013) e definiram o período mínimo de 17 e 22 dias respectivamente, como adequado para satisfazer os parâmetros contagens de coliformes a 30°C e 45°C, *Staphylococcus* coagulase positivo, pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria* spp. (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015).

Posteriormente, estudos com a avaliação de queijos de outras microrregiões foram concluídos e, atualmente, a legislação estadual de Minas Gerais, por meio das Portarias nº 1305 de 2013 (MINAS GERAIS, 2013) e nº 1736 de 2017 (MINAS GERAIS, 2017), estabelecem diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, com definição do período de maturação para a microrregião de Araxá de no mínimo de 14 dias, do Serro mínimo de 17 dias e para as microrregiões da Serra da Canastra, do Cerrado, de Campo das Vertentes, da Serra do Salitre e do Triângulo Mineiro em 22 dias.

Vale ressaltar que estes estudos não consideraram a eficiência do processo de maturação na inibição de patógenos importantes para saúde pública como *M. bovis* e *Brucella* spp., por não serem contemplados na legislação vigente (BRASIL, 2001). Recentemente, estudo avaliou a sobrevivência de *M. bovis* amostra BCG em queijo Minas artesanal e, quando o patógeno foi

inoculado isoladamente no leite sobreviveu por 60 dias de maturação, já quando *M. bovis* foi inoculado em conjunto com bactérias ácido-láticas das espécies *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, após 45 dias de maturação o patógeno não foi mais detectado por cultivo (OLIVEIRA, 2018). No entanto, apesar do período de maturação para redução de *Brucella abortus* e *B. melitensis* ter sido estudado em outras variedades de queijos, como Camembert (PLOMMET et al., 1988), Parmesão (STARIKOFF et al., 2016), Cheddar, Limburguer (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946) e queijo tradicional de leite de cabra (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011), não há estudos com queijo Minas artesanal, mesmo *Brucella* spp. já tendo sido detectada neste tipo de queijo (DUCH, 2015).

A implementação da maturação como forma de garantir a qualidade sanitária dos queijos, pressupõe que organismos patogênicos, mesmo se presentes inicialmente no leite e no queijo fresco, não sobreviveriam ao baixo pH, baixa  $a_w$ , alta concentração salina e a competição por nutrientes com os diferentes microrganismos, incluindo bactérias ácido-láticas, que compõem a microbiota do queijo (BROOKS et al., 2012). No entanto, a inativação de um patógeno durante a maturação do queijo será dependente da espécie de microrganismo presente, da carga microbiana inicial e das alterações nas características intrínsecas e extrínsecas do queijo (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

A atividade de água ( $a_w$ ) indica a quantidade de água que está disponível para uso bacteriano e possui relação com a umidade do queijo e com o ambiente em que é realizada a maturação. Durante a maturação ocorre perda de umidade do queijo para o ambiente, reduzindo tanto a umidade quanto a  $a_w$  do produto (DONNELLY, 2004). Estas alterações resultam em diminuição do metabolismo ou morte de alguns microrganismos e contribui com o controle de patógenos que estiverem presentes no produto (BERESFORD et al., 2001).

Os queijos Minas artesanais são classificados como queijos de média umidade (entre 36 e 45,9%) (MINAS GERAIS, 2008). No entanto, em queijos maturados por longo período a umidade pode apresentar valor inferior ao da legislação. Em queijos das microrregiões do Serro, da Serra da Canastra e de Campos das Vertentes a umidade variou de 18 a 55 %, com menores valores no produto maturado por 64 dias (MACHADO et al., 2004; COSTA JÚNIOR et al., 2009, 2014; DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015). Em relação a  $a_w$ , queijos frescos das microrregiões da Serra da Canastra e do Serro apresentaram valor de cerca de 0,99, enquanto no queijo maturado a  $a_w$  reduziu para 0,91 em 64 dias. A redução da  $a_w$  e da umidade foram associadas a redução das contagens microbianas nesses queijos (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015).

A salga possui importância no sabor e textura dos queijos, sendo as concentrações de cloreto de sódio (NaCl) diferentes entre as variedades, chegando a 6% ou mais em alguns queijos (GUINEE; FOX, 2004). Para os queijos Minas artesanais a salga é feita empiricamente com sal grosso, resultando em queijos com teores entre 1,4 e 2,8% de NaCl dependendo da propriedade e do tempo de maturação (COSTA JÚNIOR et al., 2009; DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015). O aumento da concentração de NaCl ao longo da maturação está relacionado a redução da umidade dos queijos (DE PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

O teor de NaCl ocasiona redução da  $a_w$  com seleção de microrganismos e na ação de enzimas, com aumento na pressão osmótica da fase aquosa do queijo, com consequente desidratação tanto do produto quanto das células bacterianas, sendo que a sensibilidade ao NaCl varia entre as espécies, e pode impedir o crescimento ou ocasionar morte dos patógenos (GUINEE; FOX, 2004).

Como exemplo de patógenos sensíveis ao NaCl podemos citar *Campylobacter jejuni*, que em são inibidos em concentrações maiores que 1,0% de NaCl (DOYLE; ROMAN, 1982). Por outro lado, *E. coli* possui diferença de crescimento em diferentes concentrações de NaCl, crescendo vigorosamente em 2,5% de NaCl, lentamente em 6,5% de NaCl e não cresce em 8,5% de NaCl (BELL, 2002) e *Staphylococcus* spp. pode crescer em até 15% de NaCl, mas só produz enterotoxinas em meios contendo até 10% de NaCl estiver presente no alimento (BAIRD-PARKER, 1990). Além de influenciar na sobrevivência de patógenos, o teor de NaCl também influencia no crescimento das bactérias ácido-láticas, com crescimento das bactérias “starter” no início da maturação, em menores concentrações de NaCl e de espécies não “starters” em concentrações salinas mais elevadas (GUINEE; FOX, 2004).

Ao longo da maturação, o pH do queijo passa por variações, por ação de microrganismos e enzimas, apresentando valores próximos a 4,5, pela produção de ácidos orgânicos por bactérias ácido-láticas no início do processo e valores próximos a 6 nas fases mais avançadas da maturação, por produção de compostos nitrogenados alcalinos ou aminados decorrentes da proteólise (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001).

Em queijo Minas artesanal estudos que avaliaram o pH em 64 dias de maturação encontraram valores semelhantes para os queijos da Serra da Canastra e do Serro, com variação de pH 4,8 a 5,3 (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015). Na região de Campo das Vertentes, o pH dos queijos variou de 5,0 a 5,5 em 30 dias de maturação (COSTA JÚNIOR et al., 2014). E, em queijos de Araxá, o pH foi entre 4,6 a 5,1 nos 57 dias de maturação (SALES, 2015). Os estudos demonstram influência do período de maturação no pH dos queijos, com pH mais alto ao final do processo, em fases mais avançadas da maturação, justificado pela proteólise decorrente do processo (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; COSTA JÚNIOR et al., 2014; MARTINS et al., 2015; SALES, 2015)..

O pH do queijo determina a sucessão de microrganismos que atuam nos processos metabólicos e a atividade de enzimas (LAW, 2001). A maioria dos microrganismos patogênicos, como por exemplo *Brucella* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, possuem pH ótimo para o crescimento entre 6,0 e 7,5, mas conseguem sobreviver em pH mais ácido (BAIRD-PARKER, 1990; EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990; EL-GAZZAR; MARTH, 1992; HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007; ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). No entanto, este parâmetro exerce efeito importante no controle de patógenos no queijo, por alterar o funcionamento de enzimas e da célula microbiana, com redução da energia celular disponível para o crescimento dos patógenos (ADAMS; NICOLAIDES, 1997).

O pH também é importante para determinar a sucessão de bactérias ácido-láticas no queijo. Algumas espécies toleram valores de pH de 3,2 a 9,6, mas a maioria crescem melhor em pH 4,0 a 4,5 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). *Lactobacillus* spp., por exemplo, podem crescer em meios com pH menor que 4,5, enquanto que *Streptococcus* spp. são mais sensíveis ao baixo pH, e crescem melhor em meios com pH 5,1 (ADAMBERG et al., 2003).

Outra forma de controle de microrganismos na maturação dos queijos é a alteração do potencial de oxirredução, que é reduzido no queijo pela produção de CO<sub>2</sub> durante a fermentação proveniente do metabolismo de algumas bactérias ácido-láticas (heterofermentadoras) e ocasiona redução do pH intracelular, com a inibição de reações enzimáticas, interrompendo o transporte de nutrientes,

contribuindo com a inibição do crescimento de patógenos, principalmente daqueles que não sobrevivem em condições de oxigênio reduzido no ambiente (ADAMS; NICOLAIDES, 1997).

Todos estes fatores mencionados anteriormente atuam de forma sinérgica nos queijos, conferindo características organolépticas peculiares ao longo do processo de maturação. O efeito dessas alterações físico-químicas no queijo tem interferência direta na sobrevivência de patógenos, e estudos com diversas variedades de queijos produzidos experimentalmente e queijos comerciais já foram realizados, incluindo com queijo Minas artesanal (BORELLI et al., 2006b; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; COSTA JÚNIOR et al., 2014; MARTINS et al., 2015).

Além das alterações nos parâmetros físico-químicos do queijo ao longo da maturação, a presença da microbiota competidora leva ao esgotamento de nutrientes e produção de substâncias com efeito antimicrobiano, que contribuem para redução da multiplicação de patógenos ao longo da maturação (ADAMS; NICOLAIDES, 1997).

### **3.9. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS EM QUEIJOS E SEUS EFEITOS ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS**

Os parâmetros intrínsecos e extrínsecos do queijo, como concentração salina, pH, potencial de oxidação-redução, atividade de água, concentração de nutrientes, presença de microbiota competitiva e de substâncias com efeito antimicrobiano determinam as sucessões de populações microbianas no queijo ao longo da maturação e, de acordo com as características e exigências de crescimento de cada microrganismo, fenômenos cooperativos ou antagônicos podem ocorrer (SMID; LACROIX, 2013).

As bactérias ácido-láticas fazem parte da microbiota benéfica que se desenvolve no queijo e podem ser divididas em dois grupos com base no metabolismo de carboidratos: bactérias que produzem ácido lático como principal produto da fermentação de glicose, chamadas homofermentadoras, como algumas espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, e alguns *Lactobacillus*, e as bactérias que produzem lactato, dióxido de carbono e etanol, chamadas heterofermentadoras, como algumas espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactobacillus* (ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

Algumas espécies de bactérias ácido-láticas podem ser adicionadas intencionalmente para produção de diferentes variedades de queijo ou em alguns, como no queijo Minas artesanal, sendo provenientes do leite, do fermento endógeno, de utensílios, da água e do ambiente da queijaria. Diferentes espécies e concentrações dessas bactérias podem ser encontradas nos produtos de cada propriedade (CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2017). Quando presentes, bactérias deste grupo microbiano podem ser uma alternativa na inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos no queijo, principalmente por atuarem na competição por nutrientes, produção de metabólitos tóxicos, e secreção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos, etanol, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (BOURDICHON et al., 2012; SMID; LACROIX, 2013).

O ambiente do queijo propicia o crescimento de bactérias ácido-láticas, que produzem como metabólitos ácidos orgânicos, principalmente lático e, em menor concentração, ácidos acético, fórmico, propiônico, capróico, entre outros (LEROY; DE VUYST, 2004). Estes metabólitos ocasionam redução do pH do queijo, o que torna o ambiente ainda mais propício para a multiplicação destas bactérias ácido-láticas, que consomem nutrientes do meio e contribuem com

a supressão do crescimento da microbiota concorrente, incluindo patógenos, de multiplicação mais lenta em pH reduzido (ADAMS; NICOLAIDES, 1997; MELLEFONT; MCMEEKIN; ROSS, 2008).

A ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos produzidos por bactérias ácido-láticas não se restringe a redução do pH. Seu efeito inibitório ocorre principalmente pela difusão pela membrana celular do microrganismo, seguida de dissociação, com liberação de íons H<sup>+</sup>, que acidificam o citoplasma da célula (IVEY; MASSEL; PHISTER, 2013). A presença de íons H<sup>+</sup> no meio intracelular pode perturbar processos intracelulares, como o transporte de nutrientes e o funcionamento de enzimas e, até mesmo, reduzir a energia celular disponível para o crescimento do microrganismo pela energia gasta para remoção constante de íons H<sup>+</sup> de dentro da célula (ADAMS; NICOLAIDES, 1997).

As bactérias ácido-láticas podem produzir diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no queijo. A susceptibilidade a este composto varia entre os patógenos, podendo levar a um efeito bactericida ou bacteriostático, em função da concentração presente no alimento (ITO et al., 2003). Para espécies de microrganismos que não possuem, ou que possuem baixos níveis da enzima catalase, os efeitos nocivos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são mais intensos, com oxidação de lipídios e proteínas da membrana celular (LINDGREN; DOBROGOSZ, 1990). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é precursor para produção de radical hidroxila, um agente oxidante forte, que leva a danos a qualquer composto celular, inclusive ao DNA, podendo ocasionar na morte da célula bacteriana (MADIGAN et al., 2012).

O etanol e o diacetil também são produzidos em baixas concentrações durante o metabolismo de bactérias ácido-láticas (HELANDER; VON WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997). O etanol ocasiona alterações na membrana celular e na síntese de macromoléculas pelo microrganismo como lipídios e proteína (CHIOU et al., 2004). O diacetil interfere na utilização da arginina, particularmente por bactérias Gram negativo (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). Apesar do efeito limitado dessas substâncias isoladamente em patógenos, em conjunto com as outras substâncias oriundas do metabolismo microbiano contribuem com a inocuidade do queijo (IVEY; MASSEL; PHISTER, 2013).

Outra característica desejável em bactérias ácido-láticas é a produção de bacteriocinas, que são compostos proteicos biologicamente ativos, que exercem ação antimicrobiana por despolarização da membrana, inibição da síntese de peptidoglicanos da parede celular e formação de poros na membrana da célula alvo. Desta forma, atuam no controle de populações microbianas no queijo (COTTER; ROSS; HILL, 2005).

Devido a essas características, efeito antagonico das bactérias ácido-láticas contra patógenos de interesse em saúde pública e o potencial probiótico de várias espécies de bactérias ácido-láticas têm sido demonstrados em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Tabela 1. 4), com uso recomendado em queijos e outros alimentos (HERREROS et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; COSTA et al., 2013). As substâncias com efeito antimicrobiano produzidas por esses microrganismos contribuem com aumento da segurança dos alimentos e ajuda a evitar perdas econômicas decorrentes da deterioração (GALVEZ et al., 2008).



**Tabela 1. 4.** Espécies de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais das regiões da Serra da Canastra, de Araxá e de Campos das Vertentes e patógenos inibidos em teste de antagonismo *in vitro*

Região produtora	Bactéria ácido-lática testada	Patógeno inibido no antagonismo <i>in vitro</i>	Referência
Serra da Canastra	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. hilgardii</i> <i>W. paramesenteroides</i>	<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	(COSTA et al., 2013)
Serra da Canastra	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>	<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>	(ANDRADE et al., 2014)
Campos das Vertentes	<i>L. paracasei</i> <i>P. acidilactici</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i>	<i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	(SANT'ANNA et al., 2017).
Araxá	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>	<i>S. flexneri</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	(SILVA, 2016).
Serra da Canastra Campos das Vertentes Araxá	<i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>P. acidilactici</i>	<i>M. bovis</i> BCG	(OLIVEIRA, 2018)

Apesar de estudos de antagonismo com diversas amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal já terem sido realizados, não há descrição na literatura para o efeito de bactérias ácido-láticas na sobrevivência de *Brucella* spp.

### 3.10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção do queijo Minas artesanal contribui com o desenvolvimento sociocultural e econômico do estado de Minas Gerais. As características próprias de cada microrregião do Estado propiciam o desenvolvimento de bactérias ácido-láticas e outros microrganismos no queijo que desempenham papel fundamental na fermentação e maturação, conferindo características organolépticas peculiares ao produto. Além disso, a atuação das bactérias ácido-láticas no antagonismo de patógenos, por produção de diferentes substâncias e na competição por nutrientes no queijo, também contribui para inocuidade deste produto.

O processo de maturação é influenciado pela microbiota associada ao queijo, que ocasiona alterações físico químicas no decorrer do processo e contribui para a conservação e segurança do produto. No entanto, apesar de estudos anteriores terem avaliado o tempo de maturação necessário para os queijos Minas artesanal se adequarem aos parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação Estadual de Minas Gerais, a sobrevivência de patógenos de importância em saúde

pública, como *B. abortus*, ainda não foi avaliada neste tipo de queijo, com a necessidade da realização de estudos, visando contribuir no estabelecimento de diretrizes para a comercialização segura deste produto.

### 3.11. REFERÊNCIAS

ADAMBERG, K.; KASK, S.; LAHT, T. M.; PAALME, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, n. 1–2, p. 171–183, 2003.

ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, v. 8, n. 5–6, p. 227–239, 1997.

AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ (ADEPARÁ). *Portaria nº 418 de 26 de fevereiro de 2013*. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=252003>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

AHDB, Agriculture and Horticulture Development Board. *World dairy Product Production*. Disponível em: <<http://dairy.ahdb.org.uk/market-information/processing-trade/dairy-product-production/world-dairy-product-production/#.VrPzXSMrLIU>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, A. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*, v. 88, n. 4–5, p. 495–510, 2008.

ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; ACURCIO, L. B.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014.

APROCAMÉ. *Associação dos Produtores de Queijo Canastra de Medeiros - MG*. Disponível em: <<http://aprocame.com.br/>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

ARENAS, R.; GONZÁLEZ, L.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, v. 15, n. 4, p. 271–279, 2004.

ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 4, p. 579–606, 2008. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>>.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; LANGA, S.; LANDETE, J. M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-9, 2015.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 53, p. 28–37, 1998.

BACHMANN, H. P.; SPAHR, U. The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 3, p. 476–83, 1995.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, v. 19, n. 1948, p. 1S–8S, 1990.

BÁNKUTI, F. I.; MADRONAA, G. S.; POZZA, M. S. S.; BÁNKUTI, S. M. S.; SANTOS, S. S.;

- RESSUTTE, J. Potencialidades tecnológicas e qualidade da cadeia produtiva do queijo colonial na região Sul do Brasil : uma revisão. *FTT Journal of Engineering and Business*, p. 50–64, 2017.
- BARBOSA, F. H. F.; BAMBIRRA, F. H. S.; MARTINS, F. dos S.; NICOLI, J. R. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp . da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* - avaliação “ in vitro ”, “ ex vivo ” e “ in vivo ” em camundongos gnotoxênicos . *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2006.
- BELL, C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *International Journal of Food Microbiology*, v. 78, n. 3, p. 197–216, 2002.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 259–274, 2001.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 287–317, 2004.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 11, p. 1115–1119, 2006a.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enteroxigenic *Staphylococcus spp.* and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, n. 4, p. 545–550, 2006b.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus spp.* isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 481–487, 2011.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; TER SCHURE, E.; VAN BOVEN, A.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, v. 154, n. 3, p. 87–97, 2012.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos - Portaria n. 146 de 07 de março de 1996*. Brasília, 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa n° 30 de 07/08/2013. Permite que os queijos feitos a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias*. Disponível em: <[http://www.lex.com.br/legis\\_24684623\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_30\\_DE\\_7\\_DE\\_AGOSTO\\_DE\\_2013.aspx](http://www.lex.com.br/legis_24684623_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_7_DE_AGOSTO_DE_2013.aspx)>. Acesso em: 9 abr. 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Decreto n° 9013 de 29/03/2017. Regulamenta as leis 1283/1950 e 7889/1898, que dispõem sobre a inspeção*

industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017. .

BRASIL, 2001. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. *Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária.*, p. 48, 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/legis/resol/\\_12\\_01rdc.html](http://portal.anvisa.gov.br/legis/resol/_12_01rdc.html)>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais.* Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 154–158, 2012.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. *Microbiota láctica de queijos artesanais*. 1. ed. Fortaleza, Ceará: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, n. 1–2, p. 131–149, 1999.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 2016.

CEARÁ. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO CEARÁ. *Projeto de lei n.º 128/16 Dispõe sobre o processo de produção e comercialização do queijo artesanal e dá outras providências.* Disponível em: <<http://www.queijocoalhoBrasil.com/wp-content/uploads/2017/06/pl-128-2016-regularizacao-do-queijo-coalho-artesanal-no-eatado-do-ceara.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P. S.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no Mercado de Queijos no Brasil. *Informações Econômicas*, v. 39, n. 6, 2009.

CHIOU, R. Y.; PHILLIPS, R. D.; ZHAO, P.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. Ethanol-Mediated Variations in Cellular Fatty Acid Composition and Protein Profiles of Two Genotypically Different Strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2204–2210, 2004.

COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACÚRCIO, L. B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M. F. S.; NUNES, Á. C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 6, p. 1858–1866, 2013.

COSTA JÚNIOR, C. G.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R.; COSTA, R. G. B.; RESENDE, E. C.; CARVALHO, K. B. A. Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo Das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 69, n. 2, p. 111, 2014.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHAES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Variação na composição centesimal de Queijo da Serra

da Canastra durante as 4 estações do ano. *Revista do Instituto de Laticínios "Candido Tostes"*, v. 64, n. 371, p. 13–20, 2009.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Food Microbiology*, v. 3, p. 777–788, 2005.

CRUZ, L. *Cientistas explicam mofo no queijo minas artesanal*. Disponível em: <<http://minasfazciencia.com.br/2017/08/14/cientistas-explicam-mofo-branco-no-queijo-minas-artesanal/>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

DE PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F. de; FURTADO, M. M. Princípios Básicos de Fabricação de Queijo: do Histórico à Salga. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 367, n. 64, p. 19–25, 2009.

DHANASHEKAR, R.; AKKINPALLI, S.; NELLUTLA, A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs*, v. 2, n. 3, p. 101–9, 2012.

DONNELLY, C. W. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 541–559, 2004.

DORES, M. T.; FERREIRA, L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: Ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 2, n. 2, p. 26–34, 2012.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

DOYLE, M. P.; ROMAN, D. J. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 561–565, 1982.

DUCH, A. A. S. *Estimativa da prevalência de Brucella spp. em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal na microrregião do Serro - Minas Gerais*. 2015. Dissertação de Mestrado em Ciência e tecnologia de leite e derivados, Universidade Federal de Juíz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2015.

EHLERS, S.; HURT, J. *The complete idiot's guide to cheeses of the world*. Alpha ed. New York, USA: Penguin, 2008.

EL-DAHER, N.; NA'WAS, T.; AL-QADERI, S. Effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 523–528, 1990.

EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 9, p. 2327–2343, 1992.

EMATER (EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS). *Caracterização na microrregião da canastra como produtora tradicional do queijo Minas artesanal*. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo\\_historico/caracterização do queijo canastra.pdf](http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracterização_do_queijo_canastra.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2017.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). *Programa do Queijo Minas Artesanal*. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/porta.cgi?flagweb=site\\_tpl\\_queijo&id=3299](http://www.emater.mg.gov.br/porta.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299)>. Acesso em: 27 fev. 2018.

FAEMG. *Recordistas no cadastro de produtores do queijo Minas artesanal*. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/Noticia.aspx?Code=2907&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

FONSECA, M. *Governo e produtores brigam por regulamentação do queijo mineiro*. Disponível em: <[https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2017/10/02/interna\\_agropecuario,905128/governo-e-produtores-brigam-por-regulamentacao-do-queijo-mineiro.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2017/10/02/interna_agropecuario,905128/governo-e-produtores-brigam-por-regulamentacao-do-queijo-mineiro.shtml)>. Acesso em: 25 mar. 2018.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese : An Overview. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*, 3 rd., v. 1, p. 1–18, 2004.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 142–148, 2010.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIQUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. Ben. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 125–152, 2008.

GILMAN, H. L.; DAHLBERG, A. C.; MARQUARDT, J. C. The Occurrence and Survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburger Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 29, n. 2, p. 71–85, 1946.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: FOX; MCSWEENEY; COGAN; GUINEE (Ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3 rd ed. Chapman & Hall, London: Elsevier B.V., 2004. 1p. 257–302.

HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, v. 8, n. 5, p. 146–150, 1997.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 455–459, 2005.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, n. 3, p. 237–257, 2007.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Estabelecimentos inseridos SISBI/POA - Queijaria*. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/produtos-de-origem-animal2/estabelecimentos-inseridos-sisbipoa/1686>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

INTERNATIONAL DAIRY FOODS ASSOCIATION (IDFA). *History of Cheese*. Disponível em: <<http://www.idfa.org/news-views/media-kits/cheese/history-of-cheese>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

- ITO, A.; SATO, Y.; KUDO, S.; SATO, S.; NAKAJIMA, H.; TOBA, T. The Screening of Hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic Foodborne pathogens. *Current Microbiology*, v. 47, p. 231–236, 2003.
- IVEY, M.; MASSEL, M.; PHISTER, T. G. Microbial interactions in food fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 4, p. 141–62, 2013.
- KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, v. 21, n. 6, p. 805–815, 2010.
- LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 383–398, 2001.
- LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 8, p. 1748–1760, 1987.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.
- LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 1, p. 266–272, 2009.
- LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 7, n. 1–2, p. 149–63, 1990.
- LUIZ, L. M. P.; CASTRO, R. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; NUNES, A. C.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n. 1, p. 1–4, 2016.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 516–521, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*, 12ª. ed. Artmedl, Porto Alegre, 2010.
- MARÉCHAL, C. Le; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LOIR, Y. Le. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-A review. *Dairy Science and Technology*, v. 91, n. 3, p. 247–282, 2011.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 219–230, 2015.
- MATO GROSSO DO SUL. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. *Lei nº 2.820 de 04/05/2004. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Artesanal Caipira, e dá outras providências.* Disponível em: <<http://www.al.ms.gov.br/Detail?Id=73722>>. Acesso em: 23 nov. 2015.
- MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy*

*Technology*, v. 57, n. 2–3, p. 127–144, 2004.

MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, n. 2, p. 157–168, 2008.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F.; LÓPEZ-MERINO, A.; SUÁREZ-GÜEMES, F. *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 12, p. 1257–61, dez. 2011.

MENESES, J. N. C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil*. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 21 fev. 2016.

MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica de América Central*, v. XIII, n. Número Especial EGAL, p. 1–16, 2011.

MINAS GERAIS. *Lei nº 14.185/2002. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências*. Disponível em: <[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2010.

MINAS GERAIS. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *Portaria nº 818, de 12 de dezembro de 2006: Baixa o regulamento técnico de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências*. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/338-portaria-818](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/338-portaria-818)>. Acesso em: 26 mar. 2018.

MINAS GERAIS. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *Decreto nº 44.864, de 1 de agosto de 2008. Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal*. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=44864&ano=2008>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 594, de 10 de junho de 2003 - Identifica a microrregião de Araxá*. Belo Horizonte, 2003a. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 591, de 26 de maio de 2003 – Inclui município na microrregião do Serro*. Belo Horizonte, 2003b. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 694, de 17 de novembro de 2004 – Identifica a microrregião da Canastra*. Belo Horizonte, 2004b. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 1403, de 2 de maio de 2004. Identifica a Região do Vale do Jequitinhonha como produtora de queijo cabacinha*. Belo Horizonte, 2004a. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 874, de 02 de outubro de 2007 – Altera a denominação da microrregião do Alto Paranaíba para microrregião do Cerrado*. Belo Horizonte, 2007. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria 1022, de 03 de novembro de 2009 – Identifica a microrregião de Campo das Vertentes*. Belo Horizonte, 2009. .



BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1305 de 30 de Abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal, 2013.* .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria Nº 1397, de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de queijo Minas Artesanal*. Belo Horizonte, 2014c. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1428, de 29 de agosto de 2014 Identifica a Microrregião da Serra do Salitre como produtora do Queijo Minas Artesanal*. Belo Horizonte, 2014a. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1427, de 29 de agosto de 2014. Identifica a Região do Vale do Suaçuí como produtora de Parmesão no Modo Artesanal*. Belo Horizonte, 2014b. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1453, de 01 de dezembro de 2014. Identifica a Região de Alagoa como produtora de Queijo Tipo Parmesão no Modo Artesanal*. Belo Horizonte, 2014d. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1736 de 27/07/2017: Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal, 2017.* .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Lista produtores cadastrados no programa do Queijo Minas Artesanal*. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal)>. Acesso em: 19 jan. 2018.

MINAS GERAIS.ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS. *Lei nº 20549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais*. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=20549&ano=2012>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

MINISTÉRIO DA CULTURA. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Decreto nº 3.551, de 02 de outubro de 2000 - Institui o registro de bens culturais de natureza imaterial que constituem patrimônio cultural brasileiro, cria o Programa Nacional do Patrimônio Imateria. *Brasília: Ministério da Cultura, 2000*.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. das; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. do C.; SANTOS, J. P. V. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal , fabricado na serra da canastra , Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”*, v. 363, n. 63, p. 26–30, 2008a.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. das; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. do C.; SANTOS, J. P. V. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno

utilizado na produção do Queijo Canastra. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 63, n. 364, p. 14–18, 2008b.

OLIVEIRA, L. G. de. Influência da maturação sobre a viabilidade de *Mycobacterium bovis* em queijos tipo Minas artesanal e seu antagonismo por bactérias ácido-láticas. *Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais*, p. 2018, 2018.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 2, n. 2, p. 115–129, 2005.

PASSOS, R. *Pesquisa da UFLA identifica fungo em queijo tradicional de Minas*. Disponível em: <<http://www.ufla.br/ascom/2017/05/08/pesquisa-da-ufla-identifica-fungo-em-queijo-tradicional-de-minas/>>. Acesso em: 1 mar. 2018.

PEREIRA, D. *Queijo curado vira moda na gastronomia brasileira e pontos de venda se multiplicam*. Disponível em: <<http://www.sertaobras.org.br/2015/03/02/queijo-curado-vira-moda-na-gastronomia-brasileira-e-pontos-de-venda-se-multiplicam/>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

PEREIRA, D. A. *Os desafios da cadeia do queijo Minas artesanal*. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/os-desafios-da-cadeia-do-queijo-minas-artesanal/>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

PERNAMBUCO. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE PERNAMBUCO. *Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007*. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=149693>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 293–300, 2004.

PINTO, M. S. P.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. a M.; PIRES, a C. S.; FONTES, L. B. a; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do serro, minas gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G.; COURAULT, M.; MUSSET, D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait*, v. 68, n. 2, p. 115–120, 1988.

RATTON, H. *O mineiro e o queijo: um documentário político e poético*. BrasilQueimera filmes, 2011. .

REIS, C. B. M.; BARREIRO, J. R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M. A. de F.; SANTOS, M. V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Veterinary Research*, v. 9, 2013.

REIS, G. *Confira os segredos dos melhores queijos de Minas*. Disponível em: <[https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/06/27/interna\\_agropecuario,777193/confira-os-segredos-dos-melhores-queijos-de-minas.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/06/27/interna_agropecuario,777193/confira-os-segredos-dos-melhores-queijos-de-minas.shtml)>. Acesso em: 26 mar. 2018.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; NUNES, A. F. C. A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011.

- REZENDE, D. C. De; WILKINSON, J. Coordenação da qualidade em cadeias produtivas de alimentos : O caso dos queijos finos no Brasil. *Revista Econômica*, v. 7, n. 2, p. 233–253, 2005.
- RIBEIRO, J. A. Queijos do Brasil. *Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”*, v. 14, n. 86, p. 33–34, 1959.
- RIO GRANDE DO NORTE. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE. *Lei Nº 10.230, de 07 de agosto de 2017. Dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos e manteiga artesanais do Rio Grande do Norte*. Disponível em: <[http://www.al.rn.gov.br/portal/\\_ups/legislacao/2017/08/18/33889c1489eb72dbce05b8388ff19687.pdf](http://www.al.rn.gov.br/portal/_ups/legislacao/2017/08/18/33889c1489eb72dbce05b8388ff19687.pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2015.
- RIO GRANDE DO SUL. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. *Projeto de Lei n 63/2016. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado do Rio Grande do Sul*. Disponível em: <Rio Grande do Sul>. Acesso em: 27 fev. 2018.
- ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, 2002.
- SALES, G. A. *Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano*. Dissertação de mestrado pós graduação em Ciência Animal , Universidade Federal de Minas Gerais, p. 106, 2015.
- SANT’ANNA, F. M.; ACURCIO, L. B.; ALVIM, L. B.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SILVA, A. M.; NUNES, Á. C.; NICOLI, J. R.; SOUZA, M. R. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region , Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, p. 1–10, 2017.
- SANTA CATARINA. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SANTA CATARINA. *Lei Nº 17.486, de 16 de Janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências*. Disponível em: <[http://leis.ale.sc.gov.br/html/2018/17486\\_2018\\_lei.html](http://leis.ale.sc.gov.br/html/2018/17486_2018_lei.html)>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- SERGIPE. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SERGIPE. *Lei nº 6.967 de 25/10/2010- Dispõe sobre o processo de produção de queijo de coalho artesanal no Estado de Sergipe, e dá providências correlatas*. Disponível em: <[http://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-6967-2010-se\\_165310.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-6967-2010-se_165310.html)>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- SILVA, J. G. *Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de lactobacillus spp. isoladas de queijo minas artesanal de araxá, Minas Gerais*. 2016. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Mestrado em Ciência Animal, 2016.
- SMID, E. J.; LACROIX, C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, n. 2, p. 148–154, 2013.
- SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 327–345, 2001.
- STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.;

GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, P. H. F. da; PAULA, J. C. J. de; TELLES, E. O. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3743, 2016.

SUBBARAMAN, N. *Art of cheese-making is 7.500 years old*. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/art-of-cheese-making-is-7-500-years-old-1.12020>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v. 12, n. 2–3, p. 91–109, 2002.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, v. 63, p. 201–215, 2016.

ZOTTOLA, E. A.; SMITH, L. B. Pathogens in cheese. *Food Microbiology*, v. 8, p. 171–182, 1991.

ZUCALI, M.; BAVA, L.; TAMBURINI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; SANDRUCCI, A. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 4, p. 436–441, 2011.

## 4. CAPÍTULO 2. RISCO EM SAÚDE PÚBLICA DE *Brucella* spp. EM LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS

### 4.1. RESUMO

O presente artigo revisa aspectos da brucelose humana transmitida pelo consumo de leite e produtos lácteos. A produção de leite tem importância econômica e social em todo o mundo. A riqueza de nutrientes contido neste alimento o torna essencial para população de diferentes faixas etárias e favorece a produção de inúmeros derivados lácteos. No entanto, também possibilita a sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos, que podem estar associados a casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em seres humanos. Entre os microrganismos veiculados pelo leite e seus derivados destacam-se os do gênero *Brucella*, pela relevância na pecuária e na saúde pública. Tanto a brucelose humana, como a brucelose animal apresentam distribuição mundial, sendo poucos os países considerados livres da doença, e a maior prevalência registrada em países com baixo investimento em políticas de saúde pública e saúde animal. As espécies *Brucella melitensis* e *B. abortus* são excretadas de forma intermitente no leite de animais infectados e são as de maior importância para seres humanos, devido ao hábito de consumo de leite cru e derivados não pasteurizados. Esses microrganismos podem sobreviver por tempo prolongado em diversos produtos lácteos como iogurte, manteiga e diferentes tipos de queijos, já tendo sido identificados nestes alimentos em diferentes países. Vale ressaltar ainda que mesmo em regiões não endêmicas para brucelose animal, a ingestão de produtos lácteos importados pode ser considerada uma possível fonte para infecção humana. Um maior conhecimento sobre esses patógenos propicia a adoção de medidas preventivas e de controle para assegurar a qualidade do leite produzido pelos rebanhos das propriedades fornecedoras e, conseqüentemente, dos produtos lácteos processados, garantindo a segurança alimentar e saúde pública a população.

**Palavras-chave:** Brucelose, queijo, segurança alimentar, saúde pública.

### 4.2. ABSTRACT

Milk production has economic and social importance worldwide. The nutrient richness contained in this food makes it essential for the population of all age groups and provides the production of numerous dairy products. However, it also enables the survival of several pathogenic microorganisms, which may be involved in cases of foodborne diseases in humans. Among the microorganisms present in milk and dairy products, bacteria of the genus *Brucella* excel for their importance in livestock and public health. Both human and animal brucellosis are distributed worldwide, with few countries considered free of disease, and the highest prevalence in countries with low investment in public health and animal health policies. *Brucella melitensis* and *B. abortus* are excreted intermittently in milk of infected animals and are the most important for human infections due to the consumption of raw milk and dairy products. These microorganisms can survive for a long time in various dairy products, such as yogurt, butter and different types of cheeses. Many countries have reported their presence in food. It is also worth mentioning that even in animal brucellosis non-endemic regions the intake of imported dairy products can be considered a possible source for human infection. A more comprehensive understanding of these pathogens stimulate the adoption of preventive and control measures to ensure the quality of milk in the property of origin and dairy products to guarantee the food and health security of the population.

**Keywords:** Brucellosis, cheese, food safety, public health

### 4.3. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento altamente nutritivo para seres humanos, sendo fonte de proteínas, gordura, carboidratos, vitaminas e minerais, podendo ser obtido de diferentes espécies de animais como vacas, cabras, ovelhas, búfalas, camelas e éguas (CLAEYS et al., 2014). Além das propriedades nutricionais, muitas famílias dependem de forma econômica e social da produção leiteira, contribuindo com a subsistência familiar e movimento do comércio e indústria regional e mundial (FAO, 2013).

De acordo com o boletim do IDF (Bulletin of the International Dairy Federation 489/2017489/2017), a produção global de leite em 2016 foi de aproximadamente 825 milhões de toneladas, sendo que a produção de leite das vacas representou 82,2% da produção total. Um aumento de 0,5% na produção mundial de leite foi observado em 2016 quando comparado a 2015 (IDF., 2017) No Brasil, a produção de leite no mesmo ano foi de 33,6 bilhões de litros, representando uma queda de 2,9% em relação a 2015 (IBGE, 2016).

Além do leite “in natura”, diferentes produtos lácteos são produzidos de modo artesanal e industrial, como leites fermentados, iogurtes, queijos, manteiga, entre outros, contribuindo com o crescimento da produção e maior conservação do leite pelos processos tecnológicos aplicados na fabricação dos derivados lácteos (WOUTERS et al., 2002). A inserção destes alimentos na dieta da população mundial aumentou significativamente nos últimos anos. Em 2016, mais de 6 bilhões de pessoas consumiram leite e produtos lácteos no mundo, sendo o consumo per capita médio de 110,2 kg/ano (FAO, 2017).

A rica composição do leite e dos produtos lácteos propicia também a sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em seres humanos, com ocorrência de diversas condições clínicas e mortalidade (TAUXE et al., 2010). Assim, o consumo especialmente de leite cru e derivados não pasteurizados representa um grande risco para o consumidor (CLAEYS et al., 2014). *Brucella* spp. é um patógeno frequentemente transmitidos por meio do consumo de leite cru e derivados lácteos para seres humanos. Além disso, esse microrganismo é de extrema importância na pecuária e apenas alguns países são declarados livres da brucelose animal (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006; OIE, 2013).

A brucelose é considerada uma das zoonoses mais importantes e difundidas no mundo pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006; FAO, 2008; OIE, 2013), com cerca de 500.000 novos casos de brucelose humana relatados anualmente (PAPPAS et al., 2006b). A doença possui distribuição mundial, sendo mais prevalente em países com deficiências nas políticas de saúde pública e animal (CDC, 2012).

A ocorrência da brucelose na população humana está muito frequentemente associada ao contato direto ou indireto com animais infectados ou seus produtos (CORBEL et al., 2006). *Brucella* spp. pode ser excretada diretamente via glândula mamária de animais infectados e sobreviver no leite cru e durante etapas da produção de produtos lácteos, levando a infecção em seres humanos (DAVIES; CASEY, 1973; CAPPARELLI et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

A ocorrência de brucelose em seres humanos por via alimentar é uma preocupação constante em muitas regiões do mundo onde o hábito de consumo do leite e produtos lácteos não pasteurizados

é comum (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). Aliado a isso, um segmento crescente da população acredita que o consumo de leite cru possui efeitos benéficos à saúde, reduzindo alergias e melhorando o funcionamento de seus sistemas nervoso, digestivo e imunológico, além de considerar o sabor do leite melhor (LEAMY; HEISS; ROCHE, 2014). Mesmo com suas qualidades, o consumo de leite cru é considerado um risco potencial para os seres humanos por transmissão de vários patógenos (ZEINHOM; ABDEL-LATEF, 2014), os quais podem ser ainda maiores considerando fatores referentes ao hospedeiro, como imunossupressão e subnutrição (LUND; O'BRIEN, 2011).

Portanto, esta revisão teve como objetivo esclarecer os principais aspectos da brucelose transmitida para seres humanos por meio da ingestão de leite e derivados, considerando os principais produtos lácteos associados a ocorrência desta zoonose.

#### **4.4. GÊNERO *Brucella* spp.**

O gênero *Brucella* pertence à família  $\alpha$ 2-Proteobacteriaceae, ordem Rhizobiales e Família Brucellaceae (GARRITY, 2005). Atualmente, 12 espécies bacterianas são descritas como pertencentes a esse gênero (Tabela 2. 1) (LPSN, 2018). Cada espécie possui um hospedeiro preferencial, porém algumas possuem a capacidade de infectar também outras espécies de animais, incluindo, anfíbios, mamíferos domésticos e silvestres, e o ser humano (Tabela 2. 1).

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos, Gram-negativo, com diâmetro de 0,5-0,7  $\mu$ m e comprimento de 0,6-1,5  $\mu$ m, não móveis, aeróbios, não formadoras de cápsula, esporos ou flagelos, catalase positivo e consideradas parasitas intracelulares facultativos de macrófagos e monócitos (GARRITY, 2005; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

Diferentes características coloniais em relação à estrutura da parede celular são observadas entre as espécies do gênero, sendo os isolados classificados como lisos ou rugosos (Tabela 2. 1). As colônias lisas são mais virulentas do que as colônias rugosas, devido à sua capacidade de evasão do sistema de defesa do hospedeiro e da presença da cadeia "O" na estrutura do lipopolissacarídeo (LPS) (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Esta cadeia "O" do LPS é essencial para a virulência do patógeno, por inibir a apoptose celular, evitando assim a ativação da resposta imune e facilitando a entrada do microrganismo nos macrófagos (CARVALHO NETA et al., 2010).

**Tabela 2. 1.** Espécies de *Brucella* spp. que causam doenças em seres humanos e animais, com os hospedeiros principais e ocasionais associados.

<b>Espécie</b>	<b>Colônia</b>	<b>Hospedeiros preferênciais</b>	<b>Hospedeiros ocasionais</b>	<b>Infecção humana</b>	<b>Referências</b>
<i>B. abortus</i>	Lisa	Bovinos	Búfalos, Iaque, Bisão, Camelo e Equinos	Sim	(DENNY, 1973; GLYNN; LYNN, 2008; BANDYOPADHYAY et al., 2009; MEGERSA et al., 2011; RHYAN et al., 2013)
<i>B. canis</i>	Rugosa	Cães	-	Sim	(CARMICHAEL; BRUNER, 1968; LUCERO et al., 2005)
<i>B. ceti</i>	Lisa	Cetáceos	-	Sim	(SOHN et al., 2003; MCDONALD et al., 2006; FOSTER et al., 2007; GUZMÁN-VERRI et al., 2012)
<i>B. inopinata</i>	Lisa	Humanos	Sapos e Arraias	Sim	(SCHOLZ et al., 2010; SOLER-LLORENS et al., 2016; EISENBERG et al., 2017; KIMURA et al., 2017)
<i>B. melitensis</i>	Lisa	Caprinos e ovinos	Ovinos, Camelos, Bovinos, Antílopes e Peixes	Sim	(VIGEANT; MENDELSON; MILLER, 1995; RENUKARADHYA; ISLOOR; RAJASEKHAR, 2002; EL-TRAS et al., 2010; MEGERSA et al., 2011)
<i>B. microti</i>	Lisa	Ratazana	Raposa e Javali	Indeterminada	(STOENNER; LACKMAN, 1957; SCHOLZ et al., 2008b; RÓNAI et al., 2015)
<i>B. neotomae</i>	Lisa	Rato do deserto	-	Sim	(STOENNER; LACKMAN, 1957; SUÁREZ-ESQUIVEL et al., 2017; VILLALOBOS-VINDAS et al., 2017)
<i>B. ovis</i>	Rugosa	Ovinos	-	Não	(BUDDLE, 1956)
<i>B. papiionis</i>	Lisa	Babuínos	-	Indeterminada	(WHATMORE et al., 2014)
<i>B. pinnipedialis</i>	Lisa	Pinnípedes	-	Sim	(SOHN et al., 2003; FOSTER et al., 2007)
<i>B. suis</i>	Lisa	Suínos	Bovinos, Equinos e Cães, Lebre, Caribu, Rena e Roedores.	Sim	(HEISCH et al., 1963; COOK; KINGSTON, 1988; FORBES, 1991; GYURANECZ et al., 2011; RAMAMOORTHY et al., 2011; TAE et al., 2012; QUANCE et al., 2016)
<i>B. vulpis</i>	Lisa	Raposa	-	Indeterminada	(SCHOLZ et al., 2016)



A comunidade científica discute sobre a classificação taxonômica do gênero *Brucella*, devido à alta homologia genética entre as diferentes espécies por meio de ensaio de hibridização DNA-DNA, sugerindo um gênero monoespecífico, composto por *Brucella melitensis*, com as outras espécies sendo denominadas biovariedades ou biovares (VERGER et al., 1985). No entanto, este conceito ainda não foi bem aceito, sendo mantido a nomenclatura baseada em diferentes espécies dentro do gênero (MORENO; CLOECKAERT; MORIYÓN, 2002; OSTERMAN; MORIYÓN, 2006).

As diferenças de patogenicidade, preferências de hospedeiros, condições de cultura, ensaios bioquímicos, crescimento em CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S, sensibilidade a corantes, reação a soros monoespecíficos anti-A e anti-M, impacto econômico na indústria pecuária e perdas econômicas de proibições de comércio internacional entre todos os membros do gênero *Brucella* levou a um sistema de classificação taxonômica que distingue *Brucella* spp. em espécies e biovares (ALTON et al., 1988; CLOECKAERT et al., 1995; CORBEL, 1997; FOSTER et al., 2009; SANTOS et al., 2013). Estudos anteriores demonstraram que *B. abortus* é composto por set biovares, *B. melitensis* por três biovares e *B. suis* por cinco biovares (ALTON et al., 1988; OCAMPO-SOSA; AGUERO-BALBÍN; GARCÍA-LOBO, 2005; LE FLÈCHE et al., 2006). As demais espécies possuem uma única biovariedade. Uma breve descrição das espécies de *Brucella* spp. é feita a seguir.

*Brucella abortus* infecta principalmente bovinos, causando principalmente aborto e retenção de placenta em fêmeas e lesões no trato reprodutivo de machos (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). *B. abortus* é o segundo agente zoonótico mais importante do gênero, sendo apenas superado em número de casos e gravidade da doença por *B. melitensis*, que ocasiona doença principalmente em cabras e ovelhas, geralmente caracterizada por abortos, morte fetal e falhas reprodutivas (GODFROID et al., 2005).

*B. suis* e *B. canis* também foram descritas como capazes de infectar humanos. No entanto, *B. suis* tem predileção por suínos, causando lesão inflamatória crônica do trato reprodutivo, enquanto o *B. canis* afeta a população canina, causando distúrbios reprodutivos intermitentes em fêmeas e epididimite e prostatite em machos (LUCERO et al., 2005; HOLST et al., 2012; PILO et al., 2015; QUANCE et al., 2016).

Durante anos, *B. neotomae* tinha sido considerado um agente não zoonótico, mas recentemente esta bactéria limitada a ratos do deserto também foi associada a infecção humana, causando neurobrucelose (SUÁREZ-ESQUIVEL et al., 2017) e episódios de mal-estar, febre intermitente e desorientação (VILLALOBOS-VINDAS et al., 2017).

*B. ceti* e *B. pinnipedialis* são agentes patogênicos de mamíferos marinhos. *B. ceti* tem sido isolada em baleias e golfinhos, causando placentite necrosante, aumento testicular com presença de abscesso e morte fetal (GUZMÁN-VERRI et al., 2012). *B. pinnipedialis* afeta focas, leões marinhos e morsas (FOSTER et al., 2007). No entanto, apenas um caso relatou placentite supurativa como uma patologia associada à infecção por este patógeno nesses hospedeiros (DUNCAN et al., 2014). Ambas bactérias também podem afetar seres humanos (SOHN et al., 2003; MCDONALD et al., 2006).

*B. ovis* tem sido relatada como agente causador de epididimite ovina (principal sinal clínico observado em condições de campo), falhas reprodutivas (concepção reduzida e abortos espontâneos) e fraqueza em cordeiros recém nascidos (ARSENAULT et al., 2004). Além disso, os dados da literatura científica apoiam a idéia de que esta bactéria não é patogênica para seres humanos ou outras espécies animais (BLASCO; NIELSEN; DUNCAN, 1990; MORENO, 2014; FORBES, 2018).

Até o momento, *B. microti*, *B. paponis* e *B. vulpis* são patogênicos apenas para animais. Não há evidência de transmissão desses agentes para seres humanos, e não se sabe se eles são patogênicos para o homem. Além disso, *B. microti* foi isolado em ratazanas doentes (sinais clínicos de

extremidades edematosas), raposas saudáveis e javali (HUBÁLEK; SCHOLZ; SEDLÁČ, 2007; SCHOLZ et al., 2008b, 2009; RÓNAI et al., 2015). A sobrevivência a longo prazo deste microrganismo no meio ambiente (amostras de solo) foi demonstrada (SCHOLZ et al., 2008a). *B. papionis* foi isolado a partir de esfregaços de conteúdo cervical e uterino de babuínos após o nascimento fetal, em animais com história do aborto (WHATMORE et al., 2014), sendo, até então, a única descrição dessas espécies bacterianas causando infecção animal. Finalmente, *B. vulpis* foi isolado do linfonodo mandibular de uma raposa vermelha assintomática na Áustria (SCHOLZ et al., 2016). Por outro lado, *B. inopinata* raramente foi encontrada em seres humanos (MORENO, 2014). Este microrganismo foi isolado de um paciente com pneumonia crônica, de um implante mamário e do sangue de uma mulher com sinais sugestivos de brucelose (SCHOLZ et al., 2010; TILLER et al., 2010). No entanto, alguns estudos identificaram *B. inopinata* com maior frequência em abscesso subcutâneo, lesões cutâneas, medula óssea e fígado de sapos, sem determinar a fonte de infecção para este hospedeiro ou se eles são um hospedeiro natural desta bactéria (JIMÉNEZ DE BAGÜÉS et al., 2014). Mas, recentemente, com a identificação de *B. inopinata* em arraiais, foi sugerida que a água é um meio de transmissão para animais aquáticos. Até o momento, não há evidências de transmissão zoonótica deste agente entre humanos e anfíbios ou humanos e arraiais (EISENBERG et al., 2017).

Além disso, o uso de técnicas moleculares, como MLVA (do inglês multilocus variable-number tandem-repeat analysis), MLST (multilocus sequence typing) e sequenciamento do genoma inteiro, também contribuíram para uma melhor compreensão da epidemiologia, história evolutiva, adaptação da bactérias nos diferentes hospedeiros e, conseqüentemente, o aumento das estratégias para o controle da brucelose (CLOECKAERT et al., 1995; LE FLÈCHE et al., 2006; FOSTER et al., 2009; MINHARRO et al., 2013; GEORGI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017).

#### **4.5. HISTÓRICO DA BRUCELOSE HUMANA VIA INGESTÃO DE LEITE E DERIVADOS**

A brucelose é uma enfermidade antiga, sendo descrita a milênios. Exames antropológicos por macroscopia, microscopia e raio-x revelaram a presença de lesões líticas em vértebras lombares, sugestivas da doença no esqueleto de um dos primeiros ancestrais do homem (*Pliocene hominin species Australopithecus africanus* Stw 431), que foi encontrado na África do Sul com idade estimada de 2,4 a 2,8 milhões de anos (D'ANASTASIO et al., 2009). Trabalhos arqueológicos sugerem que a brucelose também pode ter sido endêmica na sociedade romana e durante a Idade Média, a partir da detecção de lesões sugestivas em esqueletos identificados em sítios arqueológicos na Jordânia e territórios da Palestina, áreas onde se acredita ter iniciado a domesticação de animais dessas regiões geográficas. Portanto, é possível relacionar a ocorrência da brucelose em seres humanos desde tempos longínquos ao hábito da ingestão de proteína de origem animal, como o leite cru, carnes e membranas fetais de jovens antílopes e outros animais infectados com *Brucella* spp. (D'ANASTASIO et al., 2011).

Registros arqueológicos também mostram que *Brucella* spp. poderia estar presente, mesmo que em baixa prevalência, na população de cabras domésticas no período neolítico na região dos Zagros, Oriente Médio. Com o aumento da domesticação da espécie para exploração de corte e leite, condições propícias permitiram que o patógeno permanecesse em alguns animais reservatórios e posteriormente se difundisse para outras populações. Com o maior contato, manipulação, movimentação de rebanhos infectados e, conseqüentemente, a ingestão de leite e carne dessas criações a brucelose se disseminou entre animais e seres humanos (FOURNIÉ; PFEIFFER; BENDREY, 2017).

Outros achados condizentes com a ocorrência da brucelose desde o princípio da domesticação dos animais pelo homem e do potencial zoonótico da doença foram encontrados por exames antropológicos de 250 esqueletos, vítimas de uma erupção vulcânica no monte Vesúvio, Itália, em 79 a.C. (CAPASSO, 2002). Em 17,4% dos esqueletos de adultos foram encontradas lesões ósseas típicas de brucelose, como lesões líticas e esclerose em vértebras lombares (CAPASSO, 2002). Este autor relaciona o consumo de leite de cru de cabra e derivados com a infecção humana,

apoiado na detecção de um morfotipo semelhante a *Brucella* spp., por microscopia eletrônica de varredura, em amostras de queijo carbonizado, datado de 2 mil anos, encontrado na região italiana (CAPASSO, 2002).

Apesar dos achados arqueológicos anteriormente sugerirem a ocorrência da brucelose em animais e seres humanos desde tempos antigos, o primeiro registro da brucelose data de 1859, realizado cirurgião Jeffrey Alien Marston, que descreveu a enfermidade em si mesmo e em habitantes da ilha de Malta no Mediterrâneo (NICOLETTI, 2002). A sintomatologia clínica caracterizada por bacteremia febril prolongada, anemia, dores reumáticas e inchaço das articulações levou a doença a ser conhecida como febre de Malta, febre ondulante e febre do Mediterrâneo (VASSALLO, 1992).

A ocorrência de muitos casos de febre, calafrios, mal-estar, linfadenopatia e até mesmo choque e morte em soldados britânicos que habitavam a ilha de Malta estimulou maiores esforços do serviço médico do Exército inglês na investigação da causa da enfermidade. Até que em 1887, David Bruce isolou o agente etiológico da brucelose do baço de um dos soldados e o denominou de "*Micrococcus melitensis*". Anos depois o agente foi renomeado como *Brucella melitensis* em sua homenagem (NICOLETTI, 2002).

Em bovinos, o microrganismo foi isolado do útero e membranas fetais de uma vaca em 1895, por LF Benhard Bang, um patologista e bacteriologista dinamarquês, que denominou a enfermidade de aborto infeccioso bovino, e na época denominou o agente de "*Bacillus abortus*" (NICOLETTI, 2002).

A natureza zoonótica da enfermidade passou a ser questionada em 1904, com criação de uma comissão do governo britânico para investigar as fontes de infecção humana (VASSALLO, 1992). ZAMMIT (1905) isolou o microrganismo e observou aglutinação do sangue de cabras na presença do microrganismo, comprovando o envolvimento destes animais com a doença. Posteriormente, foi constatada a eliminação do microrganismo no leite de cabras, o que possibilitava a infecção por via oral de seres humanos (HORROCKS, 1905).

Em 1905, o transporte de cabras leiteiras maltesas para os Estados Unidos resultou na infecção da tripulação com "*Micrococcus melitensis*", reforçando a correlação entre a ingestão de leite de cabra com a ocorrência da doença em seres humanos (VASSALLO, 1992). Em 1906, o leite de cabra foi proibido na dieta de militares do exército britânico, diminuindo o número de casos de brucelose para um décimo nos soldados, mas a doença continuou endêmica na população civil (VASSALLO, 1992).

Schroeder e Cotton deram continuidade no estudo sobre a *Brucella* spp., demonstrando experimentalmente em 1911 que a inoculação de leite bovino infectado em cobaias resultava no desenvolvimento de uma doença crônica. Eles postularam que o microrganismo isolado nos animais era semelhante ao "*Bacillus abortus*", agente relacionado ao aborto infeccioso em bovinos. Os autores também constataram que "*B. abortus*" estava presente em 11% (8/77) das amostras de leite provenientes de 19% (6/31) dos laticínios amostrados Maryland, EUA e já se preocupavam com o significado deste achado para a saúde pública (SCHROEDER; COTTON, 1913).

Em 1914, o Major J Crawford Kennedy alertou para infecção por "*Micrococcus melitensis*" em vacas na Inglaterra, devido a aglutinação de leite e soros de animais sadios frente ao microrganismo (VASSALLO, 1992).

Alice Evans publicou um trabalho demonstrando semelhanças morfológicas, imunológicas e de cultivo entre as bactérias isoladas por David Bruce e L.F. Benhard Bang, com definição de que "*B. abortus*" e "*M. melitensis*" eram da mesma espécie, e que o agente era eliminado no leite de bovinos assintomáticos de forma intermitente (EVANS, 1918). Posteriormente, os

microrganismos foram agrupados no gênero *Brucella*, devido as semelhanças morfológicas e bioquímicas, e. renomeados como *Brucella abortus* e *Brucella melitensis*, em homenagem a David Bruce, pioneiro no isolamento do agente (MEYER; SHAW, 1920).

A ideia de que “*Bacillus abortus*” e “*Micrococcus melitensis*” eram agentes do mesmo gênero conduziu à discussão sobre o papel do leite bovino e caprino como fonte de infecção em seres humanos. Os fatos citados somados ao estudo que detectou a aglutinação em amostras de leite e no soro de seres humanos, que não tinham contato com cabras, quando expostos ao “*Micrococcus melitensis*” fomentaram, já naquela época, a discussão sobre a importância da ingestão de leite de animais infectados pela população e sua relação direta com a saúde pública (EVANS, 1924). As pesquisas de Alice Evans foram fundamentais na implementação obrigatória da pasteurização do leite em 1930 nos EUA, que resultou na quase eliminação da “febre de Malta” em seres humanos no país (COLWELL, 1999)

Em 1921, um estudo realizado por meio do fornecimento de leite caprino e bovino artificialmente infectado com *Brucella* spp. para macacos e demonstrou que uma dose 1000 vezes maior de *B. abortus* era necessária para infecção por via oral nestes animais quando comparada a *B. melitensis*, demonstrando diferença na virulência entre estes microrganismos (FLEISCHNER et al., 1921). Resultados similares aos descritos pelo estudo realizado em macacos por FLEISCHNER et al., (1921) foram encontrados na infecção experimental de seres humanos com leite contaminado com cultura de *Brucella* spp. (MORALES OTERO, 1948). O referido estudo corroborou com o achado sobre a patogenicidade inferior de *B. abortus* comparada com *B. melitensis*, mas também concluiu que a menor patogenicidade de *B. abortus* para o homem resulta da necessidade de ingestão em doses repetidas do microrganismo para estabelecimento da infecção, enquanto que de *B. melitensis* bastava uma única dose. No entanto, o autor não descreve qual a dose necessária para a infecção via oral em seres humanos por *Brucella* spp. (MORALES OTERO, 1948).

Apesar da dose necessária para ocorrência de infecção de seres humanos por *Brucella* spp. permanecer incerta, atualmente é conhecido tanto o risco deste patógeno por ingestão de leite e produtos lácteos contaminados como o risco biológico deste patógeno, inclusive com possível uso em bioterrorismo pela possibilidade de transmissão aérea e a indução de doença debilitante e crônica no homem (PAPPAS et al., 2006a).

#### 4.6. EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE HUMANA

A ocorrência da brucelose na população humana está intimamente relacionada com fatores socioeconômicos e hábitos culturais, ocorrendo principalmente nas regiões do mundo em que a doença nos animais é endêmica e onde é comum a ingestão de leite cru e seus derivados (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006).

A transmissão de *Brucella* spp. para seres humanos pode ocorrer por inalação, contato conjuntival, abrasão de pele, e por ingestão de carne crua ou mal cozida, leite e derivados lácteos contaminados (FRANCO et al., 2007). A transmissão inter-humana é rara, com relatos escassos, citando ainda as vias sexual, transplacentária, aleitamento materno, transfusão sanguínea e transplante de medula (PALANDUZ et al., 2000; POULOU et al., 2006; KATO et al., 2007; FRANCO et al., 2007).

A brucelose é também uma doença de caráter ocupacional, geralmente descrita em pessoas que trabalham diretamente com animais, como magarefes, veterinários e trabalhadores rurais (GLYNN; LYNN, 2008). Casos de brucelose decorrentes de inoculação acidental de vacina viva e exposição acidental em trabalhadores de laboratório também tem sido reportados (BERKELMAN, 2003; ASHFORD et al., 2004; BOUZA et al., 2005).

Um estudo realizado na Turquia comparou as taxas de infecção em seres humanos de acordo com o consumo de leite cru e fervido, encontrando maiores incidências nas regiões onde a população

apresentava o hábito de ingestão de leite cru. Neste estudo foi observado também maior risco de infecção nos grupos da população que trabalhavam diretamente na ordenha e na produção de produtos lácteos, corroborando também com trabalhos que descrevem o caráter ocupacional da doença (CELEBI; CELEBI; BALKAN, 2013).

Estima-se que entre 10 e 100 células de *Brucella* spp. sejam capazes de ocasionar doença em seres humanos por via aerógena (PAPPAS et al., 2006b). Em camundongos, a infecção via intragástrica com cerca de 500 unidades formadoras de colônia (UFC) de *B. melitensis* levou a infecção em 50% dos animais (DI 50), enquanto a dose de 16 UFC levou a infecção de 1 em cada 10 animais, o que nos leva a inferir que baixas doses do patógeno poderiam ocasionar em infecção por via oral em seres humanos (VERGER, 1991). Aliados a isso, estudos realizados nas décadas de 20 e 40, em primatas e seres humanos, já demonstravam a veiculação de *Brucella* spp. pelo leite de bovinos e caprinos, sendo a via oral capaz de causar brucelose nos dois grupos em estudo (FLEISCHNER et al., 1921; MORALES OTERO, 1948).

A brucelose humana raramente leva a morte, no entanto, possui um caráter debilitante que não pode ser ignorado. Em sua fase aguda, acarreta no paciente sintomas não específicos, extremamente semelhantes a outras infecções, com ocorrência de febre intermitente, sudorese noturna, cefaleia, calafrios, artralgias, depressão, perda de peso e mal-estar generalizado (PAPPAS et al., 2006b; FRANCO et al., 2007). A enfermidade possui período de incubação de duas a três semanas e os sintomas podem durar de dias a anos. Já na fase crônica, em situações em que paciente não tenha sido submetido a tratamento adequado ou esteja em recorrência da enfermidade, poderão ser observadas lesões granulomatosas em qualquer órgão, complicações osteoarticulares e infecções geniturinárias (FRANCO et al., 2007; LAWINSKY et al., 2010).

A subnotificação da brucelose em animais e seres humanos ainda é um problema, e, por isso, não se conhece muito a sua importância e as perdas ocasionadas por essa doença na população humana ao redor do mundo, sendo que em muitos países não há programas de vigilância nacional ou estes não estão totalmente desenvolvidos (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006; PAPPAS et al., 2006). Destaca-se ainda o baixo índice de suspeita da doença por parte dos médicos, pela dificuldade no diagnóstico da brucelose em seres humanos, caracterizada geralmente por sintomatologia inespecífica, não compondo a lista de enfermidades suspeitas durante um atendimento clínico (DOGANAY; AYGEN, 2003; FRANCO et al., 2007). Além disso, há dificuldade em se determinar quais os testes podem ser utilizados em larga escala para diagnóstico da brucelose no homem, uma vez que os testes laboratoriais disponíveis apresentam baixa especificidade, com possibilidade de reação cruzada com outros patógenos (LAWINSKY et al., 2010).

Desta forma, é essencial que os profissionais da saúde disponham de estrutura laboratorial e testes adequados para realização do diagnóstico da brucelose em seres humanos e que os médicos incluam na anamnese questionar ao paciente a respeito do contato com animais e hábitos alimentares, como de consumir leite cru e derivados, por exemplo. Desta forma espera-se o aumento nas notificações da brucelose em seres humanos, melhora nos métodos de diagnóstico e, em decorrência, a implementação de medidas de controle para a doença (SMITS; KADRI, 2005).

A incidência de brucelose varia amplamente entre e dentro dos países, de acordo com fatores demográfico, ocupacionais e socioeconômicos, e principalmente em função da prevalência da doença em animais (DEAN et al., 2012; MORENO, 2014). Embora a doença seja de distribuição global, são consideradas áreas de alto risco, com alta incidência de brucelose humana, a Bacia do Mediterrâneo (Portugal, Espanha, sul da França, Itália, Grécia, Turquia, Norte da África), México, América do Sul e Central, Leste da Europa, Ásia, África e países do Oriente Médio (CDC, 2018). Apenas no ano de 2016 mais de 160 mil casos de brucelose humana foram relatados no mundo, com maiores números no Quênia, Iêmen, Irã, Turquia, Arábia Saudita, Palestina e México (OIE, 2018).

Vale ressaltar que mesmo em áreas não endêmicas para *B. abortus* ou *B. melitensis* situações de brucelose “importada” podem ocorrer, com aquisição da doença em viagens para locais endêmicos, por ingestão de alimentos típicos produzidos com leite cru, e ainda aquisição de produtos lácteos transportados em bagagens para países livres da doença (MEMISH; BALKHY, 2004; PAPPAS et al., 2006; NORMAN et al., 2016). De fato, no Reino Unido, um paciente que ingeriu queijo macio feito de leite cru da Síria se infectou com *B. melitensis* (BROUGH et al., 2011). Também na Espanha, duas famílias de imigrantes marroquinos que ingeriram leite cru no país pelo hábito e crença dos efeitos benéficos e foram infectados com *B. melitensis* (RAMOS et al., 2008).

A literatura relata diversos surtos de brucelose em seres humanos por ingestão de leite e queijos frescos e demonstra que quase totalidade foi ocasionado por *B. melitensis* (Tabela 2. 2). Estes casos mostram a falta de conhecimento da população a respeito do risco relacionado ao consumo de lácteos e derivados sem tratamento térmico ou de origem não inspecionada. Um exemplo é desinformação sobre a importância do período de maturação na qualidade sanitária dos queijos produzidos com leite cru. Estes relatos evidenciam a necessidade do esclarecimento e divulgação para a população dos riscos de ocorrência da brucelose por ingestão de leite cru e derivados e das formas de evitarem esses riscos. Ressalta-se ainda que em regiões onde a produção e consumo destes alimentos são culturalmente estabelecidos, o debate a respeito da importância da sanidade animal para qualidade dos produtos deve ser intensificado.

**Tabela 2. 2.** Surtos de brucelose humana associado com ingestão de leite e derivados lácteos contaminados.

<b>País do surto</b>	<b>Ano</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Produto lácteo</b>	<b>Nº casos</b>	<b>Referência</b>
Estados Unidos	1973	<i>B. melitensis</i>	Queijo fresco mexicano	3	(ALTEKRUSE et al., 1998)
Estados Unidos	1983	<i>B. melitensis</i>	Queijo fresco mexicano	31	(ALTEKRUSE et al., 1998)
Estados Unidos	1985	<i>B. melitensis</i>	Queijo fresco mexicano	9	(ALTEKRUSE et al., 1998)
Argentina	1993	<i>B. melitensis</i>	Queijo de cabra de leite cru	9	(WALLACH et al., 1994)
Espanha	2002	<i>B. melitensis</i>	Queijo de leite cru de cabra	11	(MÉNDEZ MARTÍNEZ et al., 2003)
Itália	2005	<i>B. abortus</i>	Queijo Pecorino importado	5	(FARINA et al., 2008)
Espanha	2006	<i>B. melitensis</i>	Leite cru de cabra	9	(RAMOS et al., 2008)
Bulgária	2007	<i>Brucella</i> spp.	Leite cru e derivados de caprinos e contato com animais	47	(TZANEVA et al., 2007)
Reino Unido	2007	<i>B. melitensis</i>	Queijo macio originário da Síria	1	(BROUGH et al., 2011)
Grécia	2008	<i>B. melitensis</i>	Queijo de leite de cabra e ovelha	85	(KARAGIANNIS et al., 2012)
Peru	2008	<i>B. melitensis</i>	Queijo branco de cabra	13	(ROMÁN et al., 2013)
Israel	2011	<i>B. melitensis</i>	Leite Camelo	15	(SHIMOL et al., 2012)
Malásia	2012	<i>B. melitensis</i>	Leite cru de cabra	79	(LEONG et al., 2015)
França	2012	<i>B. melitensis</i>	Queijo Tome Blanche de leite cru bovino	1	(MAILLES et al., 2012)
México	2012	<i>B. melitensis</i>	Queijo fresco	14	(MORALES-GARCÍA et al., 2015)
Qatar	2014	<i>B. melitensis</i> e <i>B. abortus</i>	Leite cru de camelos	14	(GARCELL et al., 2016)
Israel	2014	<i>B. melitensis</i>	Queijo originário da Palestina	105	(MEGGED et al., 2016)
Bulgária	2015	<i>Brucella</i> spp.	Leite cru e derivados de caprinos e contato com animais	31	(NENOVA et al., 2015)
Chile	2016	<i>B. melitensis</i>	Leite cru ou derivados lácteos	8	(OLIVARES et al., 2017)
Estados Unidos	2017	<i>B. abortus</i> RB51	Leite cru	1	(COSSABOOM et al., 2018)

Em relação a ocorrência de brucelose na população humana na África, os dados são escassos, mas a presença de anticorpos anti-*Brucella* em seres humanos tem sido reportada, principalmente em grupos de risco como trabalhadores de frigorífico e fazendeiros em Uganda, Togo, Nigéria, Tanzânia, Etiópia, Chade, Namíbia e Gambia (DUCROTOY et al., 2015). Quênia, Tunísia, Eritreia foram os países com maior número de casos relatados de brucelose humana na África em 2017 (OIE, 2018), e apesar da baixa prevalência em humanos em algumas regiões, como em Gambia e Togo, o contato com animais e o consumo de leite cru de bovinos, cabras e ovelhas mostraram-se importantes fatores de risco para ocorrência da doença, especialmente em crianças (DEAN et al., 2013; GERMERAAD et al., 2016).

A brucelose está também entre as zoonoses mais preocupantes em países do Oriente Médio, onde a doença tem sido relatada em seres humanos em praticamente toda região, com maior incidência no Iêmen, Turquia, Iraque, Israel, Irã, Palestina, Síria, Jordânia, Arábia Saudita e Omã (OIE, 2018). Nesses países a maior ocorrência é da infecção por *B. melitensis*, mas *B. abortus* tem sido responsável por um número crescente de casos nos últimos anos, com ocorrência da doença em diferentes espécies de animais e hábito de consumo leite e derivados lácteos não pasteurizados (REFAI, 2002).

Além dos países do Oriente Médio, China e Índia são os países que apresentam dados mais preocupantes em relação a brucelose humana na Ásia. Na China, a brucelose em seres humanos reemergiu nos anos 90. De 1955 a 2014 foram notificados 513.034 casos, com 170 mortes, sendo a maior parte dos casos entre 2004–2014 de origem ocupacional (LAI et al., 2017). Mais de 90% dos casos humanos ocorrem no norte do país, mas a expansão da criação de animais, para outras áreas contribui com a disseminação da doença (KONG, 2018). O país possui um programa específico para a vigilância da ocorrência de casos em humanos (ZHONG et al., 2013), sendo importante destacar que a *B. melitensis* é responsável pela maior número dos casos e que as taxas de incidência de brucelose humana estão associadas à regiões onde há maior densidade de ovinos e caprinos (JIA; JOYNER, 2015).

Na Índia, a brucelose humana é considerada um problema de saúde pública negligenciado, em função do elevado número de caso em animais, proximidade de animais silvestres, pobreza e condições precárias de higiene em que vive a população, o que é determinante para a ocorrência da brucelose humana no país, ocasionada principalmente por *B. melitensis* e *B. abortus* (RENUKARADHYA; ISLOOR; RAJASEKHAR, 2002; MANTUR; AMARNATH, 2008). Este cenário é agravado considerando que o aumento do consumo de produtos lácteos no país tem levado a uma intensificação da produção leiteira, o que aumenta o risco de brucelose humana (SMITS; KADRI, 2005).

No continente Europeu, em 2012, 376 casos de brucelose foram confirmados em 27 países da União Europeia, 73% dos casos observados ocorreram na Grécia, Espanha, Itália e Portugal. Nestes países, o consumo de produtos de origem animal em viagens para áreas endêmicas foram relatadas em 19,1% dos casos (EUROPEAN ..., 2014).

Em relação aos países da Oceania, sabe-se que a Austrália e a Nova Zelândia são livres da brucelose animal causada por *B. abortus* e *B. melitensis* (ADLAM, 1978; MORE; RADUNZ; GLANVILLE, 2015). No entanto, *B. suis* em suínos selvagens ainda ocorre na Austrália (MOR et al., 2018). Em 2014, foram notificados 17 casos de brucelose humana Austrália, sendo que 3 destes casos foram ocasionados por *B. suis* e o restante dos casos foram ocasionados por *B. melitensis*, onde a infecção dos pacientes ocorreu durante viagens a outros países (CORVISY et al., 2015).

No continente Americano, a importância da brucelose humana varia entre os países, sendo altamente prevalente no México e em países da América do Sul (MORENO, 2014). Na América Central os dados são escassos, porém decorrentes de subnotificação, pois são países em que a



população possui o hábito de ingestão de leite cru e derivados lácteos e a doença ocorre nos animais (MORENO, 2002).

Nos EUA, em 2010 foram notificados 115 casos de brucelose humana. O maior número de casos foi registrado nos estados do Texas, Califórnia e Arizona, que são fronteiriços com o México e nos quais um número significativo da população é descendentes de mexicanos ou imigrantes. O consumo de queijo fresco, principalmente oriundo do México, está entre as mais importantes fontes de infecção para os americanos (CDC, 2012).

De fato, um estudo analisou surtos de origem alimentar entre 1993 e 2006 em 30 estados norte americanos e demonstrou que 121 foram causados por produtos lácteos contaminados. Sessenta por cento dos surtos foram ocasionados pela ingestão de produtos lácteos não pasteurizados, dos quais 42% envolveram queijo feito com leite cru e 82% consumo de leite cru fluido. Todos os 73 surtos envolvendo produtos lácteos não pasteurizados foram ocasionados por agentes bacterianos, com a detecção de *Brucella* spp. em 4% (3) dos casos, a qual não foi detectada nos surtos relacionados a produtos pasteurizados (LANGER et al., 2012).

Na América Latina, que agrega todos os países da América Central e do Sul mais o México, apesar da brucelose ser considerada uma importante zoonose, sua verdadeira incidência em seres humanos ainda é desconhecida, em decorrência da subnotificação. Um estudo que compilou dados epidemiológicos de diversos países da América Latina identificou maior ocorrência de infecções por *B. melitensis*. Os pesquisadores conseguiram isolar *Brucella* spp. em 73,3% de 1377 amostras de seres humanos e animais, coletadas entre os anos de 1968 a 1991, nas quais o maior número de isolados a partir de amostras humanas tinham como origem Argentina, Peru e México (LUCERO et al., 2008).

O México possui um sistema de vigilância da brucelose humana em clínicas médicas, hospitais e bancos de sangue, mas acredita-se que o número de casos é 30% maior que o notificado, sendo que de 1990 a 2001 foram mais de 3500 casos relatados no país, e cerca de 98% deles por ingestão de produtos lácteos contaminados (LUNA-MARTÍNEZ ; MEJÍA-TERÁN, 2002). Entre as espécies responsáveis pela infecção de seres humanos, destaca-se *B. melitensis* de origem caprina, com 93% dos casos, 5% de *B. melitensis* de origem bovina, 1,5% de *B. abortus*, de origem bovina, e 0,5% de *B. suis* de origem bovina. Vale ressaltar que no país 35% do leite bovino produzido é consumido como leite fluido ou usado para produção de queijos não pasteurizados e quase 85% do leite de cabra é utilizado para fabricação de queijos não pasteurizados (LUNA-MARTÍNEZ ; MEJÍA-TERÁN, 2002).

Na América do Sul, a incidência da brucelose humana varia de acordo com as prevalências da doença nos animais, presença ou não de *B. melitensis* no país, organização dos sistemas de saúde humana para diagnóstico e notificação da doença, e hábitos alimentares, principalmente relacionados ao consumo de leite e derivados não pasteurizados (BAUMGARTEN, 2002; ROMÁN et al., 2013; OLIVARES et al., 2017).

No Brasil, a brucelose humana é subnotificada, com pesquisadores supondo uma verdadeira incidência de 10 a 25 vezes maior do que o relatado (LAWINSKY et al., 2010). Somente *B. abortus* tem sido reportada em animais no país e um programa para controle e erradicação da enfermidade entre bovinos e bubalinos está em vigor desde 2001 (FERREIRA NETO et al., 2016). A doença no homem não é de notificação obrigatória e os dados relativos a internações no Sistema Único de Saúde (SUS) são a única forma de se obter informações a respeito da brucelose humana. De 2008 a 2018 foram registrados 252 casos de internações e nove óbitos por brucelose no Brasil, com maior ocorrência nas regiões sudeste e sul, possivelmente decorrente do maior acesso ao diagnóstico nestas localidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A brucelose humana no Brasil possui ainda caráter ocupacional, principalmente entre trabalhadores de frigoríficos (SANTOS et al., 2007; TENÓRIO et al., 2008), além disso em função do grande volume de vacinas aplicadas na população bovina e bubalina anualmente (cerca de 20 milhões de doses), acredita-se que as

inoculações acidentais com as vacinas antibrucélicas representem uma importante parcela na ocorrência da doença entre veterinários e vacinadores. Adicionalmente a doença ocupacional, o hábito de consumo de leite cru e a produção de queijos artesanais brasileiros típicos a partir do leite cru, muito provavelmente também possuem grande participação na ocorrência da brucelose humana no país, apesar do pouco conhecimento sobre o impacto do consumo destes alimentos na ocorrência da doença. No Peru, *B. melitensis* é responsável pela maior parte dos casos de brucelose humana, com descrição de surto por ingestão de queijo fresco de cabra em policiais de Lima, em 2007, demonstrando a importância desta via de infecção no país (ROMÁN et al., 2013). No Chile, a brucelose humana ocorre de forma esporádica, com registro de 13 casos entre 2000 a 2016, sendo 8 deles ocasionado por ingestão de derivados lácteos (OLIVARES et al., 2017). Neste país a ocorrência de brucelose em caprinos por *B. melitensis* foi erradicada, e a prevalência da doença em bovinos é baixa, pela adoção de programa de controle desde 1975, que vem contribuindo para redução da doença também nos seres humanos (LAVAL, 2006). No Paraguai, a brucelose é descrita principalmente nos grupos de risco, com ocorrência de *B. abortus* e *B. melitensis* (BAUMGARTEN, 2002). Na Venezuela, a ocorrência de *B. abortus* é reconhecida como problema de saúde pública, no entanto, existe uma escassez de dados a respeito da infecção humana por *B. melitensis* (VARGAS, 2002).

Apesar da falta de dados epidemiológicos concretos em muitas regiões do mundo, países com grande concentração de bovinos e pequenos ruminantes em que a brucelose causada por *B. melitensis* e *B. abortus* é endêmica, e que possuem culturalmente o hábito de consumo de leite cru e seus derivados, devem ser considerados locais de maior risco para ocorrência da doença em seres humanos, fato importante para os órgãos oficiais de saúde pública (PAPPAS et al., 2006b). Outro fator relevante que está diretamente relacionado aos casos de brucelose nos seres humanos é como os países trabalham os programas de controle da doença nos seus rebanhos leiteiros e também com a mitigação do risco em legislações relacionadas à inspeção sanitária de produtos lácteos, visto que é de conhecimento comum que a ocorrência nos seres humanos está diretamente relacionada à ocorrência nos animais (RAGAN, 2002; PAPPAS et al., 2006b; MORENO, 2014).

#### 4.7. EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE ANIMAL

A brucelose é uma doença de importância em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Seu controle e erradicação, principalmente em espécies produtoras de leite como bovinos, bubalinos, camelos, caprinos e ovinos é o ponto central para resguardar a população humana dessa infecção, além de evitar enormes perdas econômicas na pecuária, decorrentes da enfermidade (BAMAIYI, 2016).

De caráter crônico, a brucelose nos animais possui um período de incubação muito variável, de 9 a 60 dias, ou de meses a anos, tempo diretamente relacionado ao período reprodutivo da fêmea ao ser infectada. A sintomatologia da doença está relacionada principalmente à infecção do sistema reprodutivo de fêmeas e machos, pela multiplicação do patógeno no interior de macrófagos e células trofoblásticas, produzindo tipicamente placentite seguida de aborto no terço final em fêmeas gestantes e epididimite e orquite nos machos. Além disso, a glândula mamária pode ser acometida, com ocorrência de mastite (LAGE et al., 2008; CARVALHO NETA et al., 2010).

Os impactos econômicos resultantes da presença de brucelose no rebanho estão ligados a sintomatologias clínicas como ocorrência de abortos, retenção de placenta, nascimento de bezerras fracas, mortalidade perinatal, infertilidade temporária, além de custos com reposição de animais, com assistência veterinária e redução da produção de leite e carne (SANTOS et al., 2013; ALVES et al., 2015). O problema ainda é agravado pela restrição de movimento e comércio de animais, obrigatoriedade do sacrifício de animais positivos nos países em que programas de controle e erradicação da doença estão estabelecidos e, também por gastos gerados para implantação de medidas de controle, como vacinação dos animais e de erradicação nos rebanhos (ALVES et al., 2015; GUZMÁN-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Os animais se infectam com *Brucella* spp. por via oral, via aerógena ou via conjuntiva, pelo contato com secreções uterinas, placenta e feto abortados, ou ainda por contaminação da pastagem e água com esse material, que é extremamente rico no microrganismo ( $10^9$  a  $10^{13}$  UFC/grama) (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006; LAGE et al., 2008). Em decorrência da eliminação de *Brucella* spp. no leite, nos casos de infecção da glândula mamária, é possível a transmissão para bezerros pelo leite, colostro ou transmissão para outros animais do rebanho por contato com ordenhadeira mecânica contaminada com o patógeno (APARICIO, 2013). A transmissão sexual por monta natural possui pouca importância epidemiológica na ocorrência da doença, mas um maior risco de infecção é observado na inseminação artificial realizada com sêmen contaminado, pela ausência de barreiras inespecíficas (LAGE et al., 2008).

São fatores de risco para brucelose na propriedade a aquisição de animais, o tamanho do rebanho (rebanhos maiores tem maior risco), alta densidade animal, a ocorrência de aborto, não separação de animais com problemas reprodutivos do restante do rebanho e cobertura vacinal baixa ou ausente (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; MOTA et al., 2016). Em contrapartida, a maior cobertura vacinal, o uso de pasto maternidade e assistência veterinária regular são fatores protetores para que a brucelose não ocorra no rebanho (LAGE et al., 2008; MOTA et al., 2016).

Surto de brucelose em animais tem ocorrido em todo o mundo, no entanto em países desenvolvidos a doença tem sido controlada de forma mais efetiva, com programas nacionais de controle, que incluem a vacinação e testes periódicos nos rebanhos, controle eficaz de trânsito de animais e certificação de propriedades livres (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006; DORNELES; OLIVERIA; LAGE, 2017). Além disso, países que erradicaram a doença exercem medidas de vigilância rotineira em frigoríficos, por investigação dos casos de aborto, rastreamento individual dos animais, segurança nas fronteiras, possuem ainda um sistema de informação de Saúde Animal e plano de contenção em caso da ocorrência da doença (DAFF, 2009).

Em muitos países não se tem informações oficiais a respeito da ocorrência da brucelose animal, mas a maior incidência da doença tem sido relatada nos países do Oriente Médio, Mediterrâneo, África e em zonas delimitadas do México. Países da Ásia central e sudoeste asiático tem apresentado também um aumento dos casos. Por outro lado países do Oeste e do Norte da Europa, Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia estão livres de *B. abortus* e *B. melitensis* em bovinos, ovinos e caprinos (OIE, 2018).

No continente europeu a prevalência da brucelose em bovinos, ovinos e caprinos tem diminuído para níveis muito baixos em virtude dos programas de controle e erradicação, sendo oficialmente livre de Brucelose em 2012: Áustria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Estônia, Finlândia, França, Alemanha, Irlanda, Letônia, Luxemburgo, Holanda, Polónia, Eslováquia, Eslovénia, Suécia, Noruega e Suíça (EUROPEAN ..., 2014). A doença ainda é um problema na Grécia, com surtos provocados tanto por *B. melitensis* como por *B. abortus* e, na Macedônia por *B. melitensis* (TALESKI et al., 2002). Infecções ocasionais por *B. melitensis* e *B. abortus* tem sido relatados na Espanha (OIE, 2018).

Em relação aos países da Oceania, a Austrália iniciou em 1970 um programa de erradicação da brucelose bovina e em 1989 passou a ser livre da doença. Atualmente o país exerce vigilância contínua para evitar a reintrodução da doença (MORE; RADUNZ; GLANVILLE, 2015). *B. melitensis* nunca foi reportada em ovinos e caprinos no país (CORVISY et al., 2015). No entanto, a ocorrência de *B. suis* em suínos selvagens ainda ocorre, com transmissão para cães de caça (MOR et al., 2018). Na Nova Zelândia a brucelose está erradicada, sendo que casos de *B. melitensis* nunca foram reportados no país (OIE, 2018).

A brucelose está entre as enfermidades mais importantes na Ásia, principalmente no Oriente Médio, com prevalência elevada em quase todos os países da região, com exceção de Bahrain e Qatar, além disso há relatos de sua ocorrência em diferentes espécies produtoras de leite, como

bovinos, búfalos, ovinos, caprinos e camelo (REFAI, 2002; OMER et al., 2007). Em vários desses países *B. melitensis* é a espécie mais frequente, principalmente devido as medidas de vigilância e controle serem ainda pouco frequentes (REFAI M, 2002; SAMAHA et al., 2008a).

Ainda entre os países pertencentes ao continente asiático, China e Índia apresentam problemas com brucelose animal. Na China, a doença é considerada como re-emergente, e está presente em espécies leiteiras, como bovinos e ovinos, com maior frequência de *B. melitensis*, seguida por *B. abortus* (DEQIU; DONGLOU; JIMING, 2002). O país possui um programa de controle e erradicação de brucelose animal desde 1990, com abate de bovinos, ovinos e caprinos positivos (ZHONG et al., 2013). O aumento da criação de animais, principalmente suínos em algumas regiões tem contribuído com a dispersão da doença no país (KONG, 2018).

Na Índia, a brucelose é considerada endêmica em todos os estados e está presente em bovinos, bubalinos, suínos e pequenos ruminantes, com aumento dos casos, tanto por *B. melitensis* como por *B. abortus*, principalmente em função da movimentação de animais entre as regiões (RENUKARADHYA; ISLOOR; RAJASEKHAR, 2002). Observa-se ainda que os costumes de criação de diferentes espécies de animais em conjunto contribui para o aumento da distribuição da doença no país (MANTUR; AMARNATH, 2008). Adicionalmente, o fato de o país ser um grande produtor de leite associado a crença da vaca ser um animal sagrado, levam a permanência de animais infectados por *Brucella* spp., por longos períodos nos rebanhos, dificultando o controle da brucelose por meio de medidas como abate de animais positivos (AULAKH et al., 2008).

No continente africano, principalmente no norte, a brucelose é endêmica, com programas de vigilância e vacinação de animais praticamente inexistentes (DEAN et al., 2012). Além disso, as características da produção pecuária, predominantemente de pastejo irrestrito e nomadismo dificultam a identificação da doença e a avaliação do seu impacto na pecuária e para a saúde pública (DUCROTOY et al., 2015). Estudos de prevalência demonstram a ocorrência de *B. abortus* e *B. melitensis* em bovinos, ovelhas, cabras e camelos, mas ainda são necessários maiores avanços para o conhecimento da real situação da enfermidade entre os animais domésticos e principalmente em animais silvestres (MEGERSA et al., 2011; DUCROTOY et al., 2015).

Vale ressaltar que em alguns países da Ásia e África, muitas populações nômades acreditam que o leite cru de camelas possui múltiplos benefícios a saúde, e a movimentação desses animais continuamente com as famílias proporciona um aumento da disseminação da brucelose, por *B. melitensis* e por *B. abortus*, em decorrência do contato com diferentes espécies, como bovinos e pequenos ruminantes (GWIDA, 2012).

No continente americano a brucelose animal possui diferença de importância entre os países. Na América do Norte, o Canadá é considerado livre de brucelose bovina, com último caso relatado em 1989, mas suspeita-se de casos da doença em animais silvestres não confirmados (CMC, 2010). Nos Estados Unidos, a doença permanece como problema apenas em animais silvestres no Parque Nacional de Yellowstone, com ocasionais casos em bovinos ao longo dos anos (OLSEN; TATUM, 2010). Já no México, a brucelose é uma das mais importantes doenças em animais leiteiros, como bovinos, caprinos e ovinos, com risco de eliminação de *B. melitensis* e *B. abortus* no leite (MÉNDEZ-LOZANO; RODRÍGUEZ-REYES; SÁNCHEZ-ZAMORANO, 2015).

Na América Central, apenas a Costa Rica tem dados oficiais sobre a ocorrência de *B. abortus* (OIE, 2018). No entanto, estudos identificaram a presença de *B. abortus* em bovinos na Guatemala, Belize, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica e Panamá, enquanto *B. melitensis* foi relatada apenas em ovinos na Guatemala (MORENO, 2002).

Na América do Sul, a brucelose bovina e bubalina por *B. abortus* é endêmica no Brasil, com situação heterogênea na prevalência entre os estados, com implementação há mais de 15 anos há um programa de controle da doença (FERREIRA NETO et al., 2016). No país não há nenhum relato, de casos de *B. melitensis* até então (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002; LAGE et

al., 2008). Na Argentina e no Paraguai *B. melitensis* está presente e *B. abortus* está restrita a uma ou mais zonas, sendo que os dois países adotam programa de controle e erradicação buscando a redução da brucelose em animais (BAUMGARTEN, 2002; SAMARTINO, 2002; LUCERO et al., 2008; OIE, 2018) No Chile, a erradicação da brucelose bovina tem avançado ao longo dos anos na região dos lagos, principal zona produtora de leite no país, com mais de 300 propriedades certificadas como livres, com ocorrência apenas de *B. abortus* (RIVERA; RAMÍREZ; LOPETEGUI, 2002; OIE, 2018). Na Venezuela, a prevalência da brucelose em bovinos e bubalinos, causada por *B. abortus* é reconhecida como alta, mas o país enfrenta grandes dificuldades na implementação do controle da enfermidade. Não há relatos de casos em animais de brucelose por *B. melitensis* (VARGAS, 2002). No Uruguai e Equador apenas *B. abortus* foi identificada até o momento (OIE, 2018). O Uruguai, é livre de *B. melitensis* e *B. suis* e seu programa de brucelose bovina está bem avançado em direção à erradicação da doença (Aznar et al., 2014).

Os dados apresentados demonstram que em muitas regiões do mundo ainda há pouca informação sobre a brucelose em animais, o que dificulta que políticas oficiais de controle sejam adotadas. O real conhecimento acerca da situação epidemiológica da brucelose nas diferentes populações animais é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que busquem a redução dos impactos ocasionados pela enfermidade na produção animal, e conseqüente redução de casos da doença em seres humanos. Além disso, é preciso ressaltar que a informação sobre enfermidades como a brucelose é muito valiosa para o planejamento de ações de controle e erradicação, e deve ser revisada periodicamente a fim de ajustá-la ao desenvolvimento das ações de caráter público.

#### **4.8. EXCREÇÃO DE *Brucella* spp. NO LEITE**

A eliminação de *Brucella* spp. no leite pode ocorrer ao longo de toda a vida do animal infectado e é observada alta excreção durante o período após o parto ou aborto, principalmente no colostro e na fase inicial de lactação até o segundo mês (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946). Contudo, alguns animais podem eliminar o microrganismo tardiamente, nas fases finais da lactação, e ainda a eliminação de *Brucella* spp. no leite pode ocorrer por várias lactações consecutivas após infecção (MORGAN; MCDIARMID, 1960).

A sobrevivência de *Brucella* spp. nas células fagocíticas do hospedeiro permite a sua disseminação por via hematogênica, atingindo o úbere e linfonodo supramamário (MEADOR; DEYOE; CHEVILLE, 1989a). As lesões decorrentes da colonização de *Brucella* spp. na glândula mamária podem estar restritas ao aumento dos linfonodos supramamários, mas também pode ocorrer mastite multifocal difusa com infiltração intersticial de macrófagos e neutrófilos, além da diminuição da produção e aumento da contagem de leucócitos no leite (XAVIER et al., 2009). A infecção da glândula mamária possibilita a excreção de *Brucella* spp. no leite de forma contínua ou intermitente (MORGAN; MCDIARMID, 1960). Fatores como idade, genética, dieta, manejo, período da lactação, ocorrência de aborto e vacinação podem exercer influência sobre a quantidade de *B. abortus* excretada pelo animal (CAPPARELLI et al., 2009).

As concentrações de *B. abortus* excretadas durante a lactação em animais infectados naturalmente podem variar de  $10^1$  a  $10^6$  UFC/mL (CARPENTER; BOAK, 1928; DAVIES; CASEY, 1973). A concentração microbiana que levaria à infecção oral para humanos não é conhecida, como já mencionado, embora acredita-se que a menor quantidade de microrganismos presente no leite possa levar a um risco de saúde pública, uma vez que estudo com infecção experimental de seres humanos demonstra a patogenicidade de *Brucella* spp., via ingestão de leite contaminado com o microrganismo em voluntários (MORALES OTERO, 1948).

Estudo com bubalinos oriundos de área endêmica para brucelose na Itália, mostrou que 20% (101/500) dos animais eliminavam *Brucella* spp. no leite, baseado em metodologia de PCR em tempo real (CAPPARELLI et al., 2009). Destes, 84,2% (85/101), eliminavam níveis baixos ( $\leq 10^3$  UFC/mL) do microrganismo de forma intermitente, enquanto 15,8% (16/101) excretavam *B. abortus* persistentemente em níveis superiores a  $10^4$  UFC/mL (CAPPARELLI et al., 2009).

Também estudos realizados com bovinos mostraram a excreção do microrganismo no leite de animais infectados. Em infecção experimental, sem especificar a quantidade de inóculo de *B. abortus* utilizado, apenas em vacas que abortaram foi observada a eliminação do microrganismo de forma intermitente no leite (EVANS, 1918). Repetidas inoculações levaram a excreção de uma maior concentração de *B. abortus* no leite, entre  $2,5 \times 10^3$  e  $1,45 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto a inoculação única possibilitou a eliminação do microrganismo em apenas uma ordenha ( $4,5 \times 10^2$  UFC/mL) (EVANS, 1918).

Da mesma forma, ensaio experimental com infecção por *B. abortus* em cabras, demonstraram que durante a gestação, o microrganismo é eliminado no leite a altas taxas (MEADOR; DEYOE; CHEVILLE, 1989b). As cabras foram inoculadas 16 horas após o parto com altas concentrações ( $10^9$  a  $10^{10}$  UFC) de *B. abortus* 2308. Durante o experimento de 4 semanas de  $10^1$  a  $10^8$  UFC/mL de *B. abortus* foram eliminadas no leite, e alta concentração do microrganismo também foi isolada do tecido mamário e linfonodo mamário dos animais (MEADOR; DEYOE; CHEVILLE, 1989b). Além disso, as cabras infectadas experimentalmente com *B. abortus* 2308 a  $10^9$  UFC durante o pós-parto, cuja prole foi impedida de se alimentar, eliminaram uma maior concentração do microrganismo no leite (até  $10^8$  UFC/mL), em comparação com cabras que alimentavam seus filhotes, que eliminaram *B. abortus* de forma intermitentemente, cerca de  $10^1$  UFC/mL de leite (MEADOR; DEYOE; CHEVILLE, 1989). Vale ressaltar que bovinos infectados durante o período gestacional e que abortaram apresentaram maior frequência de isolamento de *Brucella* spp. no leite, porém a ocorrência de aborto não influenciou na infecção dos linfonodos e tecidos mamários dos animais (XAVIER et al., 2009).

A vacinação dos animais também pode influenciar na eliminação de *Brucella* spp. no leite. Animais desafiados na metade do período de gestação com  $10^7$  a  $10^8$  UFC de *B. abortus* 544 que foram vacinados com B19 ou com outro tipo de vacina com adjuvante, eliminam menos microrganismos no leite do que aqueles não vacinados (MORGAN; MCDIARMID, 1960).

As vacinas de *Brucella* spp. como B19 e RB51 possuem de risco zoonótico conhecido e podem ser eliminadas no leite (PACHECO et al., 2012; MIRANDA et al., 2016). Recentemente, foi relatado um caso humano de brucelose associada ao consumo de leite de vaca cru comprado de um produtor orgânico no Texas, alertando a população do risco de brucelose por amostras vacinais (COSSABOOM et al., 2018). No entanto, MIRANDA et al., (2016) demonstraram que apenas uma pequena porcentagem de animais vacinados com RB51 eliminam *Brucella* spp. no leite, e concluiu que o risco de saúde pública associado ao consumo do leite de vacas vacinadas com RB51 no período pós-parto é muito baixo (MIRANDA et al., 2016). Este estudo não detectou *B. abortus* no leite das vacas vacinadas com RB51 por bacteriologia, independentemente da vacinação previa com B19, e por PCR apenas uma das 234 amostras coletadas no período de até 63 dias pós-vacinação foi positiva.

A vacina RB51 é produzida a partir de uma amostra rugosa, usada no rebanho em diferentes situações epidemiológicas, como em regiões com alta prevalência, podendo ser aplicada em animais adultos e por repetidas vezes, com a vantagem de não interferir em testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose (DORNELES; OLIVERIA; LAGE, 2017). No entanto, deve-se atentar para o período de realização da vacinação no rebanho, uma vez que a eliminação das cepas vacinais RB51 no leite é influenciada pelo período de vacinação dos animais, principalmente devido à imunossupressão no período periparto, que prejudica os mecanismos de proteção do sistema imunológico contra *Brucella* spp. (UZAL et al., 2000; MIRANDA et al., 2016). MIRANDA et al., (2016) também destacam a necessidade de pasteurização do leite de vacas recentemente vacinadas e sugerem que a vacinação com RB51 deve ser evitada no final da gestação e no período inicial de lactação, para reduzir o risco de infecção humana (MIRANDA et al., 2016), o que foi recentemente demonstrado ser possível (COSSABOOM et al., 2018).

De fato, 23% (3/13) das vacas vacinadas com *B. abortus* RB51 durante a gestação (8 a 9 meses) eliminaram o microrganismo no leite durante 69 dias (UZAL et al., 2000). Em outro estudo

realizado durante o periparto, 16% dos animais vacinados duas vezes com B19 (aos 6 meses de idade e aos 7 meses da gestação) também eliminaram de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/mL do microrganismo no leite, por mais de sete dias. Por outro lado, quando os animais foram vacinados com B19 e revacinados com RB51 no mesmo período, foi observada menor eliminação bacteriana por leite ( $10^3$  UFC/mL), e em apenas 2% dos animais, por menos de sete dias após o parto (SAMARTINO et al., 2000).

A vacinação com B19 ou RB51 e revacinação com RB51 são recomendadas por aumentarem a proteção dos animais contra infecções e reduzirem o número de casos de aborto por *Brucella* spp. na propriedade (DORNELES et al., 2015). Os resultados dos estudos acima demonstram a importância do período de vacinação com RB51 devido a ocorrência da eliminação da amostra vacinal no leite e potencial risco zoonótico para os seres humanos, especialmente por consumo de leite cru e derivados lácteos sem tratamento térmico. Em relação a vacinação com B19 o risco de eliminação da amostra vacinal no leite é mínimo, uma vez que a vacinação é restrita as fêmeas bovinas jovens e geralmente proibida em animais adultos e gestantes. No entanto, vale ressaltar que a vacinação contra brucelose é essencial para controle da doença nos animais, e consequentemente nos seres humanos.

#### 4.9. VIABILIDADE DE *Brucella* spp. NO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS

A sobrevivência de *Brucella* spp. no leite e produtos lácteos é influenciada por diferentes fatores, como por exemplo temperatura de estocagem, pH, presença de microrganismos competidores, concentração de cloreto de sódio (NaCl), teor de gordura e umidade (ROWE, 2014). A Tabela 2. 3 apresenta os dados sobre a influência da temperatura, do pH e da atividade de água (aw) na sobrevivência de *Brucella* spp. em diferentes produtos lácteos.

A sobrevivência de *Brucella* spp. no leite cru varia de acordo com o tempo e temperatura de estocagem (Tabela 2. 3). Temperaturas mais altas, 37 e 25 °C, levaram a inativação do microrganismo mais rapidamente, que as temperatura de refrigeração e congelamento, -40 a 8 °C (KUZDAS; MORSE, 1953; FALENSKI et al., 2011). Já quando o leite foi tratado termicamente, por no mínimo de 135°C por 2 a 4 segundos, pelo processo de ultra alta temperatura (UAT), antes de ser inoculado experimentalmente com *Brucella* spp., o microrganismo conseguiu se multiplicar entre  $10^1$  e  $10^4$  UFC/mL, e persistiu em contagens elevadas até o fim de vida útil do produto (FALENSKI et al., 2011). O elevado período de sobrevivência e a multiplicação de *Brucella* no leite UAT, demonstra que a microbiota oriunda do próprio leite cru, como por exemplo bactérias ácido-láticas, podem atuar na competição de nutrientes e na redução do pH ao longo do período de estocagem e influenciar na viabilidade do patógeno (KUZDAS; MORSE, 1953).

A viabilidade de *Brucella* spp. é afetada por tratamentos térmicos, como pasteurização rápida ou lenta (KRONENWETT; LEAR; METZGER, 1954; DAVIES; CASEY, 1973) e fervura a 100 °C por 10 min, pois as altas temperaturas desses processos ocasionam eliminação do patógeno do leite (SAMAHA, 2008). A definição do tempo e temperatura da pasteurização foi estabelecida visando a destruição de *Brucella* spp., *Coxiella Burnetii* e *Mycobacterium tuberculosis* no leite, devido à resistência destes microrganismos ao calor e elevada importância em saúde pública. A implementação deste processo em nível mundial na indústria de laticínios contribuiu consideravelmente com redução dos casos de doenças por estes patógenos em seres humanos (COLWELL, 1999; CERF; CONDRON, 2006).

**Tabela 2. 3.** Sobrevivência de *Brucella* spp. em leite e derivados lácteos

Produto	Espécie/ amostra <sup>1,2</sup>	Concentração (UFC/mL)	Tipo de estudo <sup>3,4,5</sup>	Tempo de sobrevivência <sup>6,7</sup>	Temperatura de incubação (°C) <sup>3,8</sup>	aw <sup>9</sup>	pH	Referências	
<b>Leite cru</b>	<i>B. abortus</i> 2308	2 x 10 <sup>8</sup>	E	30 minutos	61,7	NE	NE	(KRONENWETT; LEAR; METZGER, 1954)	
				15 segundos	71,7	NE			
	<i>B. abortus</i> 544	4 x 10 <sup>6</sup>	E	15 segundos	71,7	NE	6,85	(DAVIES; CASEY, 1973)	
	<i>B. abortus</i> 2308	8,8 x 10 <sup>9</sup>	E	2 dias	25	NE	4,5 - 6,0	(KUZDAS; MORSE, 1953)	
				2 dias	37	NE			
<b>Leite UAT<sup>10</sup></b>				4 dias	8	NE			
				> 800 dias	- 40	NE			
	<i>B. abortus</i> 1119-3	5 x 10 <sup>7</sup>	E	> 4 dias	4	NE	NE	(FALENSKI et al., 2011)	
	<i>B. melitensis</i> bio3	2 x 10 <sup>7</sup>	E	< 10 minutos	100	NE	NE	(SAMAHA, 2008)	
	<i>B. abortus</i> 1119-3	4,7 x 10 <sup>7</sup>	E	> 87 dias	20	NE	6,9	(FALENSKI et al., 2011)	
<b>Soro</b>	<i>B. melitensis</i> 16M	5 x 10 <sup>3</sup>	E	> 87 dias	20	NE	6,9		
	<i>B. abortus</i> 544	8,8 x 10 <sup>6</sup>	E	4 dias	17-24	NE	4	(DAVIES; CASEY, 1973)	
<b>Iogurte</b>				> 6dias	5	NE	5.4 – 5.9		
	<i>B. abortus</i> 1119-3	5 x 10 <sup>7</sup>	E	3 - 5 dias	5	NE	4.2	(FALENSKI et al., 2011)	
	<i>B. abortus</i> 544	10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup>	E	22 - 25 dias	4	NE	3.8	(ZÚÑIGA ESTRADA et al., 2005)	
	<i>B. melitensis</i> s.h.	10 <sup>4</sup>	E	72 horas	37	NE	< 3	(EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990)	
	<i>B. melitensis</i> bio 3	NE <sup>3</sup>	NI	5 dias	TA	NE	NE	(SAMAHA, 2008)	
<b>Buttermilk</b>	<i>B. melitensis</i> . bio3	2 x 10 <sup>7</sup>	E	8 dias	4	NE	NE		
	<i>B. melitensis</i> . s.h	10 <sup>4</sup>	E	4 horas	37	NE	<4	(EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990)	
<b>Creme de leite</b>	<i>B. abortus</i> 5549, 5532, 80 e H1	5	E	8 -10 dias	8	NE	5	(CARPENTER; BOAK, 1928)	
	<i>B. abortus</i>	NE <sup>3</sup>	E	32 – 142 dias	8	NE	5	(CARPENTER; BOAK, 1928)	
<b>Manteiga</b>	<i>B. abortus</i>	NE <sup>3</sup>	E	4 minutos	NE	NE	NE	(BRYAN, 1944)	
<b>Tipos de queijos</b>	Queijo fresco	<i>B. melitensis</i> s.h.	E	72 horas	37	NE	<4	(EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990)	
	Limburger	<i>B. abortus</i>	NI	57 dias	4.4	NE	NE	(GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946)	
	Cheddar			E	> 6 m and < 1 a	4.4	NE		
				NI	> 6 m and < 1 a	4.4	NE		
	Camembert	<i>B. abortus</i>	10 <sup>5</sup>	E	18 dias	12	NE	4.5	(PLOMMET et al., 1988)
Parmesão	<i>B. abortus</i> 1119-3	10 <sup>8</sup>	E	25 dias	18	NE	4.9	(STARIKOFF et al., 2016)	



Queijo fresco	<i>B. abortus</i> 2308	6x10 <sup>8</sup>	E	7dias	4	0,93	5	(SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015)
Queijo maturado de leite cru	<i>B. abortus</i> 2308	1,2x10 <sup>9</sup>	E	17dias	24	0,89	4	
Queijo maturado de leite pasteurizado	<i>B. abortus</i> 2308	1,2x10 <sup>9</sup>	E	31dias	24	0,89	4	
De leite de cabra	<i>B. melitensis</i> 16M	5 x 10 <sup>9</sup>	E	> 50 dias	4	0,90	5	(MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011)
Kareish	<i>B. melitensis</i> bio 3	NE <sup>3</sup>	NI	20 – 50 dias	24	0,89	4	
				4 dias	4	NE	6.5	(SAMAHHA, 2008)
				2 dias	TA	NE	NE	

<sup>1</sup>bio = biovariedade; <sup>2</sup>s.h.= isolado de seres humano; <sup>3</sup>NE= Não especificado; <sup>4</sup>E = Experimental; <sup>5</sup>NI= Naturalmente infectado; <sup>6</sup>m =meses; <sup>7</sup>a = anos; <sup>8</sup>TA = temperatura ambiente <sup>9</sup>aw = atividade de água no queijo; <sup>10</sup>*Brucella* spp. foi inoculada no leite após tratamento térmico por ultra alta temperatura (UAT)

Apesar dos processamentos térmicos citados anteriormente inativarem *Brucella* spp. no leite, muitos países permitem legalmente a venda de leite cru e produtos lácteos fabricados com leite cru, e estes podem ser veículo de patógenos, incluindo *Brucella* spp., para seres humanos (LEAMY; HEISS; ROCHE, 2014). No caso dos derivados lácteos, dois processos envolvidos na produção, a fermentação e a maturação, alteram os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite, e além de serem essenciais para confecção das características típicas de cada produto lácteo, também propiciam melhoria na conservação e na inocuidade destes produtos (WOUTERS et al., 2002; BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Especificamente para os queijos produzidos com leite cru, um período mínimo de 60 dias de maturação em temperaturas acima de 5 ° C é regulamentado em muitos países para a comercialização destes produtos (ZOTTOLA; SMITH, 1991).

Os processos de fermentação e de maturação ocorrem por ação da microbiota e enzimas oriundas do próprio leite, inclusive bactérias ácido-láticas, ou microrganismos desejáveis adicionados intencionalmente a ele, que metabolizam nutrientes, como gordura, proteína e carboidratos (MCSWEENEY, 2004). Além disso, ocorre a liberação de metabólitos, como aminoácidos, ácidos graxos, diacetil, dióxido de carbono, tioésteres, cetoácidos, tióis, lactonas, ésteres de lipídeos, aminas, amônia, etanol e ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico), que são responsáveis pelas características do produto, como sabor, textura, cor e odor (LAW, 2001). As bactérias ácido-láticas também podem produzir substâncias com efeito antimicrobiano, como bacteriocinas (GALVEZ et al., 2008). Todas estas substâncias produzidas na fermentação ou maturação podem levar a redução do pH, aumento do teor de cloreto de sódio, redução da atividade de água e antagonizam microrganismos deteriorantes e patogênicos que podem estar presentes nos produtos lácteos (ZOTTOLA; SMITH, 1991; GALVEZ et al., 2008).

Baseado nos dados da literatura (Tabela 2. 3), é possível observar que o pH está entre os parâmetros mais importantes na redução da viabilidade de *Brucella* spp. em produtos lácteos. O pH ótimo para o crescimento do microrganismo está entre 6,6 a 7,4, que é maior que o pH da maioria dos produtos lácteos (KUZDAS; MORSE, 1953; EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990). A ação das bactérias ácido-láticas nos processos de fermentação e maturação leva a produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, que ocasiona redução do pH dos produtos lácteos, sendo que em pH abaixo de quatro a sobrevivência de *Brucella* spp. é afetada (EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990). Em produtos lácteos armazenados em temperaturas mais altas a redução do pH é ainda mais acentuada, e a sobrevivência de *B. abortus* reduzida mais rapidamente (DAVIES; CASEY, 1973).

O papel da microbiota competidora, principalmente bactérias ácido-láticas, na inibição de patógenos tem sido demonstrada em estudos “*in vitro*” e em produtos lácteos, com produção de diferentes substâncias com efeito antimicrobiano e competição por nutrientes (STECCHINI; SARAI; BERTOLDI, 1991; HERREROS et al., 2005; YANG et al., 2012). Na produção do iogurte geralmente são adicionados *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*, bactérias ácido-láticas que durante o processo de fermentação produzem ácidos lático, fórmico e fólico, que reduzem acentuadamente o pH (SMID; LACROIX, 2013). Desta forma, de acordo com as características do iogurte, a sobrevivência de *Brucella* spp. neste produto pode variar (Tabela 3) (EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990; ZÚÑIGA ESTRADA et al., 2005; SAMAHA, 2008; FALENSKI et al., 2011), no entanto, os dados mostram que a adição de *Bifidobacterium* BB-12 no processo produtivo contribui para redução mais acentuada na sobrevivência de *B. melitensis*, que foi de 1 a 3 dias, em relação a 5 a 8 dias quando não havia a presença deste microrganismo competidor (SAMAHA, 2008b).

Da mesma forma, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a sobrevivência de *B. abortus* foi suprimida em ensaio de antagonismo “*in vitro*” por bactérias ácido-láticas das espécies de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus acidilactici* isoladas de queijos Minas artesanais no Brasil. Esta microbiota

competidora atuou principalmente na redução do pH, principal fator que ocasionou na morte do patógeno (Capítulo 3 desta tese).

A literatura sobre a influência da concentração de cloreto de sódio (NaCl) na viabilidade de *Brucella* spp. em produtos lácteos é muito limitada. Elevados teores de NaCl reduzem a atividade de enzimas e microrganismos presentes nos derivados lácteos, por redução da atividade de água e umidade (GUINEE; FOX, 2004). O maior teor de NaCl nos produtos lácteos pode promover inibição do crescimento de *Brucella* spp. de acordo com um capítulo escrito por (ROWE, 2014), no entanto, as referências individuais de cada estudo não foram apresentadas. O autor cita a redução da concentração do patógeno pela metade, no período de estocagem, em manteiga com 2,3% de NaCl comparado a sobrevivência de 13 meses no mesmo produto sem NaCl. Além disso, cita que a sobrevivência de *Brucella* spp. em salmoura com concentrações de 4%, 12% e 25% NaCl foi de 28, 12 e 6 dias, respectivamente, e que no queijo Domiati com teor de 7,66 % de NaCl o microrganismo sobreviveu entre 12 e 24 dias (ROWE, 2014).

Nos produtos lácteos como manteiga e creme, a compactação de glóbulos de gordura pode contribuir para a sobrevivência do microrganismo (CARPENTER; BOAK, 1928), uma vez que *Brucella* spp. possui alta afinidade pela camada de gordura do leite (BRYAN; BRYAN, 1944). Amostras de *B. abortus* com diferentes patogenicidade em cobaias apresentaram viabilidade diferente em manteiga armazenada a 8 °C, sendo que isolado humano (H1), mais patogênico nos testes em animais, persistiu por maior período no produto que os isolados de bovinos (5549, 5532, 80), menos patogênicos (CARPENTER; BOAK, 1928).

Além da gordura, a umidade e atividade de água (aw) também são parâmetros que interferem na sobrevivência de *Brucella* spp. em produtos lácteos. O queijo é o principal produto que tem esses parâmetros alterados, sendo que o produto fresco possui maior atividade de água e umidade do que queijo maturado (BROOKS et al., 2012). No queijo fresco a contagem de *Brucella* spp. pode ser semelhante à do leite (STARIKOFF et al., 2016) e as alterações ocasionadas no processo de maturação podem reduzir a viabilidade do patógeno. No entanto, o período de maturação necessário para inativação de *Brucella* é variável de acordo com o tipo de queijo (Tabela 2. 3), além de ser dependente da contaminação inicial, das características intrínsecas e extrínsecas do queijo, bem como da concentração de gordura, redução de umidade, aw e pH que ocorre no produto (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946; PLOMMET et al., 1988; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011).

A temperatura de maturação parece ser um fator de grande influência na sobrevivência de *Brucella* spp. em queijos, assim como a microbiota e o pH. Temperaturas mais baixas propiciam a sobrevivência do patógeno, como observado em queijo de leite de cabra (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Em alguns queijos como o Camembert, a microbiota adicionada para a produção, composta de *Penicillium caseicolum*, *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremosis*, pode ter efeito na redução do pH e outras alterações no produto, contribuindo para a efetividade do processo de maturação e para a rápida redução de *B. abortus* no queijo, inclusive tendo sido confirmada após 40 dias de maturação com ingestão do produto pela equipe técnica e autores do estudo sem qualquer problema observado posteriormente (PLOMMET et al., 1988).

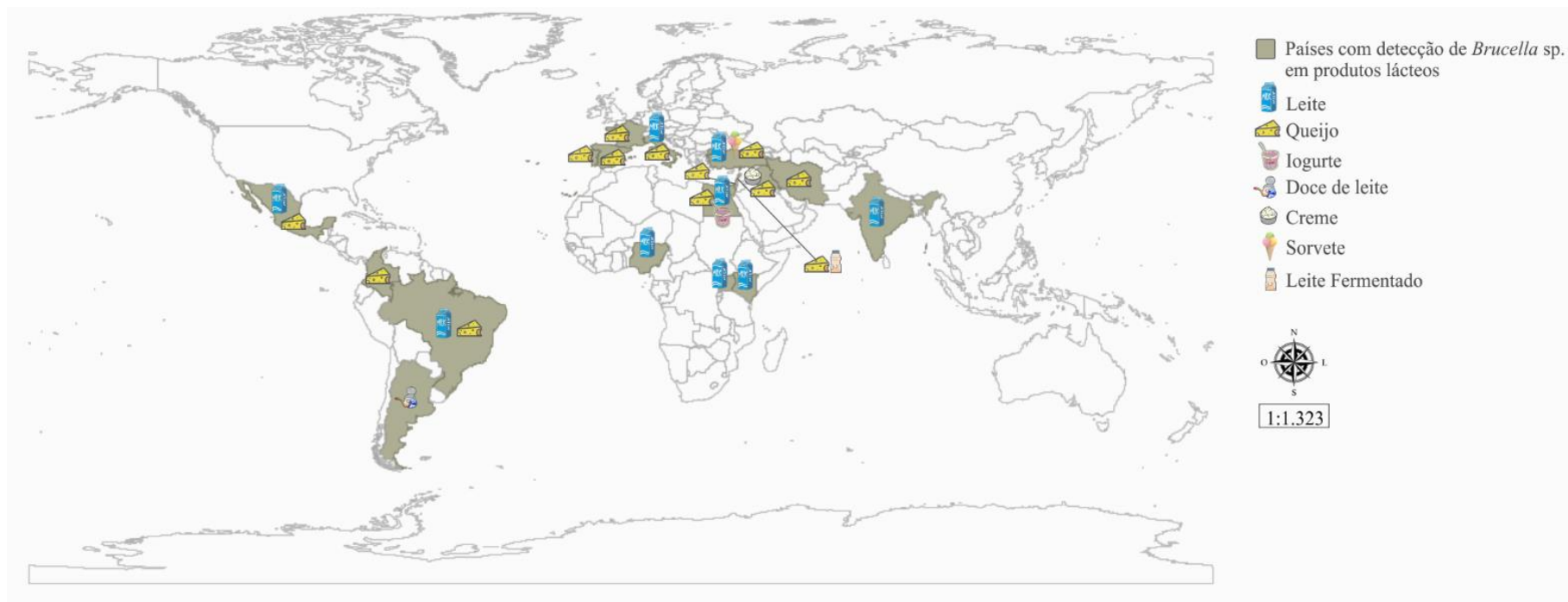
Adicionalmente, outras substâncias que podem ser incluídas durante o processo produtivo, como por exemplo em queijo Kariash, típico do Egito, em que ácido cítrico e acético são adicionados ao leite, também pode influenciar na sobrevivência de *Brucella*. Neste caso, a rápida redução do pH possibilitou a redução da viabilidade de *B. melitensis* e *B. abortus* no produto (KHALED; ESSAM, 2015).

Diante do exposto é possível observar que diferentes fatores influenciam na viabilidade de *Brucella* spp. em produtos lácteos, sendo que o pH, presença de microbiota competidora e a temperatura de maturação parecem ser os mais importantes, além disso, a presença de gordura e maior umidade também favorecem sobrevivência do patógeno, que mesmo após o processo de

fermentação e maturação *Brucella* spp. pode permanecer viável por longos períodos, podendo implicar em risco para saúde pública.

#### **4.10. *Brucella* spp. NO LEITE E EM PRODUTOS LÁCTEOS EM DIFERENTES REGIÕES DO MUNDO**

A partir da excreção de *Brucella* no leite de um animal infectado, qualquer produto lácteo produzido com leite cru pode conter o microrganismo viável, sendo potencialmente capaz de ocasionar enfermidade em seres humanos (YOON; LEE; CHOI, 2016). Desta forma, a ocorrência da brucelose na população está diretamente relacionada a prevalência da doença em animais, e a detecção do patógeno no leite e em derivados lácteos comercializados em diversos países em que a doença é endêmica tem sido constatada (Figura 2. 1) (MORENO, 2014). Diferentes técnicas de diagnóstico têm sido usadas para avaliação da presença de *Brucella* spp. no leite e seus derivados, como por exemplo cultivo em meio seletivo, exames sorológicos, como iELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática indireto) e teste do anel em leite, além de técnicas de biologia molecular, como reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR), entretanto há variações de sensibilidade e especificidade diagnóstica e analítica entre os métodos testados (HAMDY; AMIN, 2002; CAPUANO et al., 2013; WARETH et al., 2014; KAMWINE et al., 2017).



**Figura 2. 1.** Países com detecção de *Brucella* spp. em leite e derivados lácteos coletados no comércio

Em alguns países, *B. melitensis* tem sido mais detectada, principalmente quando avaliados leite e produtos lácteos de origem caprina, enquanto que em outros países, *B. abortus*, principalmente de origem bovina, tem sido identificada neste tipo de alimento (VERRAES et al., 2015). No entanto, as duas espécies de *Brucella* spp., apesar dos seus hospedeiros preferenciais, também tem sido detectadas em leite e produtos lácteos de bovinos, caprinos, ovinos, camelos e búfalos (GODFROID et al., 2013).

Em países do continente Africano, como Egito, Nigéria, Uganda e Quênia, a ocorrência de *Brucella* spp. foi descrita no leite e queijo comercializados, apesar de creme e iogurte também terem sido avaliados (HAMDY; AMIN, 2002; ARIMI et al., 2005; ABDALLAH; DAWOUD; BAZALOU, 2007; WARETH et al., 2014; IOR; CHUKWU, 2015; KAMWINE et al., 2017).

No Egito, *B. abortus* e *B. melitensis* foram detectadas no leite de vacas, cabras, ovelhas e camela. Por bacteriologia foram positivas 24/52 amostras de leite de vaca, 12/21 de ovelha, 11/18 de cabras e não se detectou o microrganismo em leite de 12 camelos amostrados. Já a PCR proporcionou a detecção de um número maior de amostras positivas, sendo 29/52 amostras de bovinos, 10/21 de ovinos, 13/18 de caprinos e 1/12 de leite de camelo (HAMDY; AMIN, 2002).

Além do leite de bovino e bubalino, outro estudo no Egito analisou amostras de iogurte e creme. No entanto, apenas amostras de leite foram positivas para *Brucella* spp., com diferença de positividade entre iELISA e qPCR. A detecção de anticorpos por iELISA ocorreu em 18/72 amostras de leite de vaca, 13/128 de leite de búfala e 3/5 amostras coletadas em tanque. Já por qPCR para região IS711 foram detectadas 9/72 amostras em leite de vaca, 7/128 de búfala e 1/5 amostra do mercado, e destas 16 foram identificadas como *B. melitensis* e uma como *B. abortus*. A maior detecção no iELISA foi atribuído aos títulos de anticorpos serem elevados por longos períodos, independente da presença do agente (WARETH et al., 2014).

Um outro estudo no Egito, conduzido apenas por bacteriologia, isolou *B. melitensis* de 10% (2/20) das amostras de queijo macio produzidos com leite cru de vaca, com 8 semanas de fabricação e 5% (1/20) dos iogurtes avaliados. (ABDALLAH; DAWOUD; BAZALOU, 2007).

Na Nigéria, tanto em amostras de tanque de propriedades (comércio *in loco*), como em amostras coletadas do mercado, anticorpos anti-*Brucella* foram detectados pelo teste do anel do leite. Das amostras coletadas *in loco* 17,74% (11/62) foram positivas, enquanto que 12,5% (5/40) dos produtos do mercado foram positivos (IOR; CHUKWU, 2015).

Em Uganda, 26,5% (49/185) das amostras de leite cru coletadas em fazendas leiteiras e laticínios, apresentaram anticorpos contra *Brucella* spp. nos ensaios de teste do anel do leite e iELISA. Além disso, foi constatada maior positividade no leite coletado em laticínios do que aqueles coletados diretamente em fazendas, resultados que foram atribuídos aos fazendeiros poderem ser tendenciosos a não adotarem medidas de controle para brucelose no rebanho pela consciência que o leite seria comercializado após pasteurização (KAMWINE et al., 2017).

No Quênia, no ano 2000, 888 amostras de leite vendidas no mercado informal, foram coletadas nas épocas da chuva e seca, e a detecção de anticorpos contra *B. abortus* foi realizada pelo teste do anel em leite e iELISA. A soroprevalência variou de 0% a 12,3% entre as amostras coletadas em diferentes regiões do país. Além disso, em questionário aplicado aos consumidores locais, a maioria relatou consumir o leite fervido, enquanto que apenas 4% deles consumiam leite cru fermentado como um produto local (ARIMI et al., 2005)

No continente Asiático, trabalhos realizados na Índia, Irã, Iraque e Líbano demonstraram a presença de *Brucella* spp. em amostras de leite, queijos, leite fermentado típicos e creme. Análises de diagnóstico do microrganismo também foram conduzidas em amostras de sorvete, coalhada e paneeer, entretanto os resultados foram negativos, como descritos a seguir (ABBAS; TALEI, 2010; ALWAN et al., 2010; AKBARMEHR, 2011; DUBEY et al., 2017).

Na Índia, de 230 amostras de leite e derivados lácteos (queijo, paneer, coalhada, sorvete e creme) coletados no mercado, 27,05% (23/85) das amostras de leite possuíam anticorpos anti-*Brucella* spp. pelo teste anel em leite, e 14 destas amostras apresentaram positividade no PCR gênero-específico. Em contraste, os demais produtos lácteos analisados foram negativos para *Brucella* spp. pela técnica de PCR (DUBEY et al., 2017).

No Irã, 1000 amostras de queijos foram coletadas da área rural e analisadas por bacteriologia. *Brucella* spp. foi isolada de 22 amostras (2,2%), sendo destas 0,7% (7/ 22) confirmadas como *B. melitensis* e 1,5% (15/22) como *B. abortus* (AKBARMEMHR, 2011).

Igualmente, no Iraque, 100 amostras de cada produto lácteo, incluindo sorvete, queijo e creme, foram analisados por bacteriologia. *Brucella* spp. foi isolada de 8 de amostras de queijo macio, sendo 5 isolados confirmados como *B. melitensis* e 3 *B. abortus*, e de uma amostra de creme, identificada como *B. abortus*. Entretanto, o microrganismo não foi detectado em nenhuma das 100 amostras de sorvete analisadas (ABBAS; TALEI, 2010).

No Líbano, foram analisadas 45 amostras de queijo Baladi (queijo libanês em bolas), 36 de Shankleesh (um queijo curado) e 83 de Kishk (leite fermentado), todos produzidos com leite cru. Os resultados obtidos por bacteriologia e confirmados por PCR demonstraram a identificação de *B. abortus* em 4%, 6% e 2% de queijo Baladi, Shankleesh e Kishk, respectivamente (ALWAN et al., 2010).

No continente Europeu, trabalhos realizados na Itália e Turquia demonstraram a presença de *Brucella* spp. em amostras de leite, queijos típicos e sorvete (KASIMOGLU, 2002; KUPLULU; SARIMEHMETOGLU, 2004; CAPUANO et al., 2013; KARA; AKKAYA, 2013).

Na Itália foram analisadas 191 amostras de queijos fabricados com leite cru usando metodologias de cultivo bacteriano e qPCR. Não foi possível a identificação de colônias de *Brucella* spp. viáveis por cultura, entretanto, o DNA bacteriano foi detectado por qPCR em 11% (11/98) dos queijos produzidos com leite de búfala, 2,7% (1/36) dos queijos feitos com leite de vaca e 10,5% (6/57) dos queijos produzidos com leite das duas espécies juntas (CAPUANO et al., 2013).

Na Turquia, por meio do isolamento e identificação bioquímica e por PCR encontrou-se *B. abortus* em 1,86% (4/215) das amostras de leite cru comercializado no país (GULBAZ; KAMBER, 2016). Os autores também analisaram 50 amostras de queijos e 50 amostras de manteiga, mas o patógeno não foi detectado em nenhuma delas. Um outro estudo realizado no país, pesquisou a presença de *Brucella* spp. em 70 amostras de leite e 35 amostras de queijo de leite de ovelha, sendo isolado *B. melitensis* em 14,2% (5/35) das amostras de queijo com contagens de  $3,6 \times 10^1$  a  $9,3 \times 10^3$  NMP/g, enquanto que resultados negativos foram observados nas amostras de leite coletadas (KASIMOGLU, 2002).

Em um outro estudo avaliando três queijos típicos na Turquia, isolou-se 2% (2/100) de *B. abortus* e de 7% (7/100) *B. melitensis* a partir de amostras de queijo fresco (Çoban cheese). Já para o queijo Afyon Tulum (Aged Skin Bag Cheese), em 2% (1/50) das amostras *B. abortus* foi isolada e 4% (2/50) eram *B. melitensis*. Em nenhuma amostra de Sheep-lamb tulum foi detectado bactérias do gênero *Brucella* (KARA; AKKAYA, 2013).

A detecção de *Brucella* spp. também foi realizada em 6,25% (5/80) dos sorvete comercializados na Turquia, sendo possível isolar *B. abortus* com  $5,4 \times 10^2$  NMP/g (KUPLULU; SARIMEHMETOGLU, 2004).

No continente Americano *Brucella* spp. já foi demonstrada em amostras de leite e queijo no México, Colômbia e Brasil (MIYASHIRO et al., 2007; SOTO-VARELA et al., 2013; PAULA et al., 2015; GUZMÁN-HERNÁNDEZ et al., 2016; GONZÁLEZ et al., 2017).

No México, foram analisadas 215 amostras de leite fresco e 31 amostras de um tipo de queijo artesanal produzido com leite cru (queso crema de Chiapas). Por meio das técnicas de isolamento e PCR, apenas 0,5% (1/215) das amostras de leite foram positivas, no entanto, o patógeno não foi detectado nos queijos (GONZÁLEZ et al., 2017). Já um outro trabalho conduzido no México detectou *Brucella* spp. em 11% (6/52) das amostras de queijos frescos, produzidos com leite de vaca, utilizando o cultivo bacteriano e confirmação das colônias por PCR (GUZMÁN-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Na Colômbia, a detecção de *Brucella* spp. por qPCR foi observada em 22,2% (6/27) das amostras de queijo fresco artesanal comercializado (SOTO-VARELA et al., 2013).

No Brasil, amostras de leite cru vendido por carroceiros (n = 30) e leite coletado antes da pasteurização na indústria (n = 50) foram avaliados pelo teste do anel do leite e por PCR para a detecção de *B. abortus*. Neste estudo, os autores detectaram 22 amostras positivas no TAL (13 amostras de laticínios e 9 oriundas de carroceiros) e 10 positivas por PCR (5 oriundas de cada fonte amostrada) (PAULA et al., 2015).

Em queijo Minas artesanal produzido com leite cru com 4 a 8 dias de maturação, da região do Serro, Minas Gerais, Brasil, foi detectado 30,9% (17/55) das amostras positivas para *Brucella* spp. no ensaio de qPCR (DUCH, 2015). As amostras positivas foram confirmadas como contaminadas por meio de sequenciamento das amostras de *Brucella* spp. de campo, com diferenciação das cepas vacinais por PCR (DUCH, 2015).

Outro estudo realizado no Brasil, analisou 192 amostras de queijo (141 Minas frescal e 51 Minas curado) coletados em São Paulo e Minas Gerais quanto a presença de *B. abortus* por bacteriologia e PCR (MIYASHIRO et al., 2007). Nenhuma amostra foi positiva por cultivo microbiológico, entretanto por PCR, 20,56% (29/141) e 15,68% (8/51) dos queijos Minas frescal e Minas curado, respectivamente, obtiveram resultados positivos. Os autores também realizaram um ensaio de PCR para distinguir as 37 amostras positivas (cepas de campo de cepa vacinal), sendo que apenas 18,92% (7/37) foram consideradas como amostras campo, enquanto que o restante eram de origem vacinal (B19), inferindo que a alta porcentagem de amostras vacinais pode ser explicada pela vacinação de animais em idade inadequada, o que levaria a excreção do microrganismo no leite (MIYASHIRO et al., 2007).

Além da detecção de *Brucella* spp. no leite e produtos lácteos em diversos países no mundo, o transporte de alimentos de forma ilegal de regiões endêmicas para *Brucella* spp. pode colocar em risco a população. Isso já foi demonstrado em estudo prévio, no qual se realizou a análise de 166 produtos lácteos (leite, leite em pó, doce de leite, iogurte e queijos) provenientes da bagagem de passageiros nos aeroportos de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil, entre 2010 e 2011. *Brucella* spp. foi detectada em 42,1% (70/166) das amostras provenientes (fabricadas) da Itália, Portugal, Espanha, França, Turquia, Líbano, Iraque, Israel e Argentina e analisadas por qPCR. Dos produtos amostrados, a maioria eram queijos (121/166), sendo que em 51,2% (62/121) dessas amostras *Brucella* spp. foi detectada (MELO et al., 2014).

Para a segurança dos consumidores torna-se imprescindível o uso de técnicas de diagnóstico que garantam a inocuidade do alimento em relação aos microrganismos patogênicos para seres humanos (CAPUANO et al., 2013). Podemos observar que parte dos estudos avaliados identificaram *Brucella* spp. em leite e produtos lácteos por técnicas de biologia molecular, como o PCR e qPCR, e apesar da bacteriologia ter sido realizada em alguns, não foi possível isolar o microrganismo em todos os ensaios. A sensibilidade analítica do isolamento para *Brucella* spp. é reconhecidamente baixa, se encontra entre 100 e 1000 UFC/mL de leite, enquanto a sensibilidade analítica da PCR pode ser superior, dependendo do método de extração e iniciadores utilizados no PCR, com valores entre 10 a 1000 UFC/mL (HAMDY; AMIN, 2002; MIRANDA et al., 2016).



Quando analisamos com mais detalhes os dados, apesar da elevada sensibilidade dos iniciadores utilizados no PCR, com detecção de amostras positivas, alguns problemas em relação a especificidade dos iniciadores podem ser percebidas, como por exemplo a ocorrência de reação cruzada com *Ochrobactrum* spp, dos iniciadores B4 e B5 (CASAÑAS et al., 2001). Desta forma, alguns estudos podem ter realizado uma análise superestimada de amostras de leite e produtos lácteos positiva para *Brucella* spp. Outro fato importante foi a descrição de alto percentual de amostras vacinais em queijos no estudo de MIYASHIRO et al., (2007). Os iniciadores utilizados no estudo para a detecção de B19 foram desenhados com a finalidade de clonagem, e não para diagnóstico, o que pode ter ocasionado resultados falso positivos. Desta forma, o risco de brucelose na população humana seria menor do que o apresentado, uma vez que a amostra de *B. abortus* B19 é conhecidamente patogênica para seres humanos (VINCENT; JOUBERT; PRAVE, 1970).

É preciso levar em conta ainda que apesar das indiscutíveis vantagens dos métodos moleculares, como PCR e qPCR, como a maior rapidez nos resultados, não necessitar de laboratório de biossegurança nível 3 e alta sensibilidade (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008), estes métodos detectam apenas o material genético do patógeno, podendo superestimar o número de células viáveis ou detectar apenas células mortas, que não colocam seres humanos em risco direto (YANG et al., 2013).

De fato, o risco para saúde pública só é confirmado pela presença de células viáveis do patógeno (ZHANG et al., 2015). Tem sido relatado o uso de intercalantes de DNA associada ao qPCR, como o propidium monoazida (PMA), que permite a discriminação entre células viáveis e mortas, para alguns microrganismos em alimentos, inclusive em produtos lácteos, como *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* (KRÜGER et al., 2014; WANG et al., 2014; CATTANI et al., 2016). No entanto, não se tem relatos do uso destes intercalantes para diagnóstico molecular de *Brucella* spp. em alimentos, que poderiam melhorar a especificidade e sensibilidade desses tipos de metodologia.

A fim de aumentar a sensibilidade do cultivo e propiciar o isolamento de *Brucella* spp. em um maior número de amostras, mesmo naquelas com baixa carga bacteriana ou que contenham células estressadas, tem sido sugerido uso do pré-enriquecimento (CURTIS; LEE, 1995; JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008), inclusive em estudos que objetivam detectar *Brucella* spp. em leite e produtos lácteos. O uso de pré-enriquecimento aumentou de 10 a 16% a recuperação de *B. abortus* no leite de rebanhos sorologicamente positivo no teste de anel em leite (BRODIE; SINTON, 1975), e em 50% a eficiência analítica do isolamento do patógeno em linfonodos de animais infectados (MINHARRO, 2009). Além disso, também possibilitou o isolamento do patógeno em amostras de queijos Minas frescal artesanais em 9,61% das amostras em que não foi possível detectar o agente por isolamento direto (ALCOLÉA, 2011).

A análise de anticorpos no leite também foi utilizada em alguns trabalhos. O teste do anel em leite possui uma sensibilidade de 85% e especificidade de 95%, enquanto o i-ELISA tem sensibilidade de 98,5% e especificidade 99,5% (KAMWINE et al., 2017). No entanto, a detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. não necessariamente confirma que o animal apresenta o microrganismo viável no leite, o que pode, assim como no caso do uso de técnicas baseada em PCR, superestimar as preocupações em relação a saúde pública. Outro fato importante é a ocorrência de amostras falso-positivos logo após o parto, perto do fim da lactação e quando a mastite está presente no rebanho (IOR; CHUKWU, 2015). Além disso, resultados falsos positivos podem ocorrer pela possibilidade de reação cruzada com outras bactérias no teste (WARETH et al., 2014).

Complementarmente a detecção de *Brucella* spp. em produtos lácteos em diferentes regiões do mundo, amostras do patógeno isoladas de queijos contaminados apresentaram resistência a diversos antimicrobianos como estreptomicina, ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, doxiciclina e ceftriaxona (ALWAN et al., 2010), resultados que aumentam sobremaneira as implicações do consumo de alimentos contaminados a

saúde da população. Além disso, achados recentes agravam este quadro, uma vez que mostram entre amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos um alto percentual (36,7%) de sensibilidade reduzida a rifampicina e pela primeira vez duas amostras resistentes a múltiplos fármacos, todos recomendados para o tratamento de seres humanos com brucelose (PAULETTI et al., 2015). Estes dados elevam a importância da veiculação de *Brucella* spp. por leite e derivados lácteos para a saúde pública.

Assim, apesar das limitações reportadas por todas as técnicas empregadas no diagnóstico para *Brucella* spp., ressaltamos que os trabalhos que identificam o microrganismo no leite e produtos lácteos no mundo são de suma importância, pois estes alertam a população e as autoridades sobre a pasteurização como uma forma importante de controle da brucelose, bem como sobre a necessidade de se conhecer a procedência dos produtos que consumimos e incentivar propriedades a controlar a doença nos rebanhos.

#### 4.11. CONCLUSÃO

A brucelose é um problema de saúde pública e saúde animal, principalmente em países em desenvolvimento, mas mesmo em regiões não endêmicas, a importação de leite e queijos frescos ilegais pode ocasionar surtos, devendo a população evitar o consumo de leite e derivados de origem desconhecida, principalmente sem tratamento térmico prévio e queijos produzidos com leite cru e sem maturação por tempo adequado. Vale ressaltar que a maturação é um fator complementar as medidas sanitárias que devem ser adotadas no rebanho para controle da brucelose, importante na eliminação do patógeno, porém o tempo adequado para inativação de *Brucella* nos queijos não está bem estabelecido. Em alguns países em desenvolvimento, os problemas no monitoramento sanitário de rebanhos e de produção de derivados lácteos muitas vezes de forma irregular e que não cumprem as boas práticas de ordenha e fabricação, aliados ao desconhecimento por parte da sociedade, incluindo médicos, sobre a importância da doença e suas vias de transmissão, pode levar a falhas na vigilância epidemiológica da brucelose, com ônus na garantia da segurança alimentar do consumidor. Medidas de educação em saúde no que diz respeito à natureza da doença e as formas de transmissão devem ser difundidas na população.

#### 4.12. REFERÊNCIAS

- ALTON, G. G., L. M. JONES, R. D. ANGUS, AND J. M. VERGER. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA Publications, Paris, France.
- ABDALLAH, M.I.M.; DAWOUD, A.S.; and BAZALOU, M.S. Occurrence of *Brucella* in some unheattreated dairy products in damietta governorate regarding its health importance.2007. Disponível em: < %20http://hdl.handle.net/123456789/20> Acesso em 11 jul. 2014.
- ALPER, S.; NESRIN, C. Bacterial contamination in fresh white cheeses sold in bazaars Canakkale, Turkey. *International Food Research Journal* v.20, n.3, p.1469-1472, 2013.
- ABBAS, B. A.; TALEI, A. B. Isolation , identification and biotyping of *Brucella* spp . from milk product at Basrah province. *Basrah Journal of Veterinary Research*, v. 9, n. 1, p. 152–162, 2010.
- ABDALLAH, M. I. M.; DAWOUD, A. S.; BAZALOU, M.. *Occurrence of Brucella in some unheattreated dairy products in Damietta governorate*. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/2007 Occurrence Of *Brucella* In Some Unheattreated Dairy Products In Damietta Governorate Regarding Its Health Importance (1).pdf>. Acesso em: 4 jul. 2016.
- ADLAM, G. H. The eradication of bovine brucellosis in new zealand: History and objectives. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 26, n. 3, p. 42–43, 1978.
- AKBARMHR, J. The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. *African Journal of Microbiology*

*Research*, v. 5, n. 12, p. 1500–1503, 2011.

ALCOLÉA, V. C. *Detecção de Brucella spp. pela reação em cadeia pela polimerase em queijos minas frescal produzidos artesanalmente na região centro oeste do estado de São Paulo*. 2011. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011.

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 10, p. 1405–1407, 1998.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. 2. ed. Paris: Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), 1988.

ALVES, A. J. S.; ROCHA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O. et al.. Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the States of São Paulo and Mato Grosso, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 118, n. 4, p. 351–358, 2015.

ALWAN, N.; SALEH, I.; BEYDOUN, E.; BARBOUR, E.; GHOSN, N.; HARAKEH, S. Resistance of *Brucella abortus* isolated from Lebanese dairy-based food products against commonly used antimicrobials. *Dairy Science & Technology*, v. 90, n. 5, p. 579–588, 2010.

APARICIO, E. D. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 32, n. 1, p. 43–51, 53–60, 2013.

ARIMI, S. M.; KOROTI, E.; KANG'ETHE, E. K.; OMORE, A. O.; MCDERMOTT, J. J. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Tropica*, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2005.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; BÉLANGER, D. Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*, v. 45, n. 4, p. 312–313, 2004.

ASHFORD, D. A.; DI PIETRA, J.; LINGAPPA, J.; WOODS, C.; NOLL, H.; NEVILLE, B.; WEYANT, R.; BRAGG, S. L.; SPIEGEL, R. A.; TAPPERO, J.; PERKINS, B. A. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v. 22, n. 25–26, p. 3435–3439, 2004.

AULAKH, H. K.; PATIL, P. K.; SHARMA, S.; KUMAR, H.; MAHAJAN, V.; SANDHU, K. S. A study on the epidemiology of bovine brucellosis in Punjab (India) using milk-ELISA. *Acta Veterinaria Brno*, v. 77, n. 3, p. 393–399, 2008.

BAMAIYI, P. H. Prevalence and risk factors of brucellosis in man and domestic animals: A review. *International Journal of One Health*, v. 2, p. 29–34, 2016.

BANDYOPADHYAY, S.; SASMAL, D.; DUTTA, T. K.; GHOSH, M. K.; SASMAL, N. K.; BHATTACHARYA, M. Seroprevalence of brucellosis in yaks (*oepagus grunniens*) in India and evaluation of protective immunity to S19 vaccine. *Tropical Animal Health and Production*, v. 41, n. 4, p. 587–592, 2009.

BAUMGARTEN, D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 63–69, 2002.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 287–317, 2004.

BERKELMAN, R. L. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 37, n. 3, p. 407–414, 2003.

BLASCO, J. M.; NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. *Brucella ovis*-Animal Brucellosis. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=QQFDHBpNnTQC&oi=fnd&pg=PA351&dq=Brucella+ovis,+in+Animal+Brucellosis+1990+blasco&ots=WmHwrjQJaz&sig=NjXHXaATVAoTElFiX91jbgd8gPw#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

BOUZA, E.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; HERNANGÓMEZ, S.; JOSÉ GONZÁLEZ, M. Laboratory-acquired brucellosis: A Spanish national survey. *Journal of Hospital Infection*, v. 61, n. 1, p. 80–83, 2005.

BRODIE, B. Y. J.; SINTON, G. P. Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *Journal of Hygiene (Cambridge)*, v. 74, p. 359–367, 1975.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 154–158, 2012.

BROUGH, H. a; SOLOMON, A. W.; WALL, R. a; ISAZA, F.; PASVOL, G. Brucellosis acquired by eating imported cheese. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v. 47, n. 11, p. 840–1, nov. 2011.

BRYAN, P. S. The viability of certain udder infection bacteria in butter made from raw cream. *Journal of Milk Technology*, v. 65, p. 1944, 1944.

BUDDLE, M. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *The Journal of Hygiene*, v. 54, n. 3, p. 351–364, 1956.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *Journal of Infection*, v. 45, n. 2, p. 122–127, 2002.

CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; IANNACCONE, M.; ROPERTO, S.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2041–2047, 2009.

CAPUANO, F.; CAPPARELLI, R.; MANCUSI, A.; ESPOSITO, S.; CORRADO, F.; GUARINO, A. Detection of *Brucella spp.* in stretched curd cheese as assessed by molecular assays. *Journal of Food Safety*, v. 33, n. 2, p. 145–148, 2013.

CARMICHAEL, L.; BRUNER, D. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *The Cornell Veterinarian*, v. 48, n. 4, p. 579–592, 1968.

CARPENTER, C. M.; BOAK, R. *Brucella abortus* in milk and dairy products. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, v. 18, n. 6, p. 743–51, 1928.

CARVALHO NETA, A. V; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, v. 184, n. 2, p. 146–55, 2010.

CASAÑAS, M. C.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; RODRIGUEZ-TORRES, A.; ORDUÑA, A.; COLMENERO, J. D.; MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target

- sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 127–131, 2001.
- CATTANI, F.; BARTH, V. C.; NASÁRIO, J. S. R.; FERREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, S. D. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 4, p. 2617–2624, 2016.
- CELEBI, O.; CELEBI, D.; BALKAN, C. E. Effects of boiling dairy products on human brucellosis. *The Eurasian Journal of Medicine*, v. 45, n. 2, p. 73–76, 2013.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *National Notifiable Diseases Surveillance System, 1993-2010*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/brucellosis/resources/surveillance.html>>. Acesso em: 12 fev. 2012.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Brucellosis: Areas at Risk*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/brucellosis/exposure/areas.html>>. Acesso em: 19 fev. 2018.
- CERF, O.; CONDRON, R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology and Infection*, v. 134, n. 5, p. 946–951, 2006.
- CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, v. 42, p. 188–201, 2014.
- CLOECKAERT, a.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; GERPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, v. 141, n. 9, p. 2111–2121, 1995.
- CMC (CANADIAN MEAT COUNCIL CONSEIL DES VIANDES DU CANADA). *Fact Sheet on Brucellosis*. Disponível em: <[http://www.cmc-cvc.com/sites/default/files/files/BrucellosisFactSheet-English\\_000.pdf](http://www.cmc-cvc.com/sites/default/files/files/BrucellosisFactSheet-English_000.pdf)>. Acesso em: 27 fev. 2017.
- COLWELL, R. R. Alice C. Evans: Breaking barriers. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 72, n. 5, p. 349–356, 1999.
- COOK, D. R.; KINGSTON, G. C. Isolation of *Brucella suis* biotype 1 from a horse. *Australian Veterinary Journal*, v. 65, n. 5, p. 162–163, 1988.
- CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, n. 2, p. 213–21, 1997.
- CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. Brucellosis in humans and animals. *Geneva: World Health Organization*, p. 89 p., 2006.
- CORVISY, R.; TRUNGOVE, M.; BRIGHT, A.; WOOD, N.; GRADIE, D.; POLKINGHORNE, B.; KNOPE, K.; PENNINGTON, K.; MORTON, B.; DE KLUYVER, R.; MARTIN, N. Australia's notifiable disease status, 2014: Annual report of the National notifiable diseases surveillance system. *Communicable Diseases Intelligence*, v. 39, n. 1, p. E46–E136, 2015.
- COSSABOOM, C. M.; KHAROD, G. A.; SALZER, J. S.; TILLER, R. V.; CAMPBELL, L. P. et al. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 infection and exposures associated with raw milk consumption — Wise County, Texas, 2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report Notes*, v. 67, n. 9, p. 285–286, 2018.

- CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN J.R. *Animal Brucellosis*. Ontario, Canada: Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 131–151.
- CURTIS, G. D. W.; LEE, W. H. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, p. 1–13, 1995.
- D'ANASTASIO, R.; STANISCIA, T.; MILIA, M. L.; MANZOLI, L.; CAPASSO, L. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiology and Infection*, v. 139, n. 1, p. 149–156, 2011.
- D'ANASTASIO, R.; ZIPFEL, B.; MOGGI-CECCHI, J.; STANYON, R.; CAPASSO, L. Possible brucellosis in an early hominin skeleton from sterkfontein, South Africa. *PLoS ONE*, v. 4, n. 7, 2009.
- DAVIES, G.; CASEY, A. The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *British Veterinary Journal*, v. 129, n. 4, p. 345–353, 1973.
- DEAN, A. S.; BONFOH, B.; KULO, A. E.; BOUKAYA, G. A.; AMIDOU, M.; HATTENDORF, J.; PILO, P.; SCHELLING, E. Epidemiology of brucellosis and Q fever in linked human and animal populations in northern Togo. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. 1–10, 2013.
- DEAN, A. S.; CRUMP, L.; GRETER, H.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Global burden of human Brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 10, 2012.
- DENNY, H. R. A Review of Brucellosis in the Horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 5, n. 3, p. 121–125, 1973.
- DEPARTAMENT OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES, D. *Eradication success story Australia is free of Brucella abortus*. Disponível em: <[http://www.daff.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/2182869/brucella-abortusoct12.pdf](http://www.daff.gov.au/__data/assets/pdf_file/0009/2182869/brucella-abortusoct12.pdf)>http://www.daff.gov.au/about>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- DEQIU, S.; DONGLOU, X.; JIMING, Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 165–182, 2002.
- DOGANAY, M.; AYGEN, B. Brucellosis: an Overview. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 2, p. 73–182, 2003.
- DORNELES, E. M. S.; LIMA, G. K.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; SRIRANGANATHAN, N.; AL QUBLAN, H.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1–25, 2015.
- DORNELES, E. M. S.; OLIVERIA, L. F.; LAGE, A. P. *Brucella abortus* vaccines: Use in control programs and immune response. *Journal of Bacteriology and Mycology*, v. 4, n. 1, 2017.
- DUBEY, P.; PATEL, K. B.; PATEL, B. K.; CHAUHAN, H. C.; CHANDEL, B. S. Molecular detection of Brucella organism from milk and milk products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 4, p. 1087–1091, 2017.
- DUCH, A. A. S. *Estimativa da prevalência de Brucella spp. em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal na microrregião do serro - Minas Gerais*. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de leite e derivados) - Universidade Federal de Juíz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2015.

DUCROTOY, M.; BERTU, W. J.; MATOPE, G.; CADMUS, S.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; GUSI, A. M.; WELBURN, S.; OCHOLI, R.; BLASCO, J. M.; MORIYÓN, I. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Tropica*, p. 1–15, 2015.

DUNCAN, C. G.; TILLER, R.; MATHIS, D.; STODDARD, R.; KERSH, G. J.; DICKERSON, B.; GELATT, T. *Brucella* placentitis and seroprevalence in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) of the Pribilof Islands, Alaska. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 26, n. 4, p. 507–512, 2014.

EISENBERG, T.; RISS, K.; SCHAUERTE, N.; GEIGER, C.; BLOM, J.; SCHOLZ, H. C. Isolation of a novel “atypical” *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 110, n. 2, p. 221–234, 2017.

EL-DAHER, N.; NA’WAS, T.; AL-QADERI, S. Effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 523–528, 1990.

EL-TRAS, W.; TAYEL, A.; ELTHOLTH, M.; GUITIAN, J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*, v. 141, p. 321–325, 2010.

ERTEM, M.; KUREKÇI, A.; AYSEV, D.; UNAL, E.; IKINCIÖGULLARI, A. Case report Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, v. 26, n. April, p. 225–226, 2000.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMERS DIRECTORATE-GENERAL. *Annual Epidemiological Report, 2014. Food and Waterborne Diseases and Zoonoses*. Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-waterborne-diseases-annual-epidemiological-report-2014.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

EVANS, A. C. Further Studies on *Bacterium abortus* and Related Bacteria : III . *Bacterium abortus* and Related Bacteria in Cow s Milk. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 23, n. 4, p. 354–372, 1918.

EVANS, A. C. Association of Schools of Public Health Malta Fever : Cattle Suggested as a Possible Source of Infection , following a Serological Study of Human Serums. *Association of Schools of Public Health*, v. 39, n. 11, p. 501–518, 1924.

FALENSKI, A.; MAYER-SCHOLL, A.; FILTER, M.; GÖLLNER, C.; APPEL, B.; NÖCKLER, K. Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, n. 1, p. 326–30, 31 jan. 2011.

FAO. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). *Contributing to One World , One Health \* A Strategic Framework for Reducing Risks of Infectious Diseases at the Animal – Human – Ecosystems Interface*. October. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj137e/aj137e00.pdf>>. Acesso em: 1 set. 2017.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). *Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets*. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6198e.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2017.

FARINA, F.; FUSER, R.; ROSSI, M.; SCOTTON, P. G. Outbreak di brucellosi nella provincia

di Treviso da formaggio pecorino importato. *Le Infezioni in Medicina*, v. 16, n. 3, p. 154–157, 2008.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

FLEISCHNER, E. C.; VECKI, M.; SHAW, E. B.; MEYER, K. F. The Pathogenicity of *B. abortus* and *B. melitensis* for Monkeys : Studies on the Genus *Brucella*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 29, n. 6, p. 663–705, 1921.

FORBES, L. B. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982-1990. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, v. 32, n. 11, p. 686–8, 1991.

FORBES, L. B. *Brucellosis in Specialized Livestock*. Disponível em: <<https://veteriankey.com/brucellosis-in-specialized-livestock/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal System Evolotion Microbiology*, v. 57, p. 2688–93, 2007.

FOSTER, J. T.; BECKSTROM-STERMBERG, S. M.; PEARSON, T.; BECKSTROM-STERMBERG, J. S.; CHAIN, P. S. G.; ROBERTO, F. F.; HNATH, J.; BRETTIN, T.; KEIM, P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 8, p. 2864–2870, 2009.

FOURNIÉ, G.; PFEIFFER, D. U.; BENDREY, R. Early animal farming and zoonotic disease dynamics: modelling brucellosis transmission in Neolithic goat populations. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 2, p. 160943, 2017.

FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R. H.; SMITS, H. L. Human brucellosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, v. 7, n. 12, p. 775–86, 2007.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. Ben. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 125–152, 2008.

GARCELL, H. G.; GARCIA, E. G.; PUEYO, P. V.; MARTÍN, I. R.; ARIAS, A. V.; ALFONSO SERRANO, R. N. Outbreaks of brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. *Journal of Infection and Public Health*, v. 9, n. 4, p. 523–527, 2016.

GARRITY, G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. the Proteobacteria*. 2. ed. v.2, p. 2816, 2005

GEORGI, E.; WALTER, M. C.; PFALZGRAF, M. T.; NORTHOFF, B. H.; HOLDT, L. M.; SCHOLZ, H. C.; ZOELLER, L.; ZANGE, S.; ANTWERPEN, M. H. Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS ONE*, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2017.

GERMERAAD, E. A.; HOGERWERF, L.; FAYE-JOOF, T.; GOOSSENS, B.; VAN HOEK, W. Der; JENG, M.; LAMIN, M.; MANNEH, I. L.; NWAKANMA, D.; ROEST, H. I. J.; SECKA, A.; STEGEMAN, A.; WEGM?LLER, R.; VAN DER SANDE, M. A. B.; SECKA, O. Low



seroprevalence of brucellosis in humans and small ruminants in the Gambia. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1–13, 2016.

GILMAN, H. L.; DAHLBERG, A. C.; MARQUARDT, J. C. The Occurrence and Survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburger Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 29, n. 2, p. 71–85, 1946.

GLYNN, M. K.; LYNN, T. V. Zoonosis Update - Brucellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 233, n. 6, p. 900–908, 2008.

GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTH, F.; MATOPE, G.; MUMA, J.; MARCOTTY, T.; PFEIFFER, D.; SKJERVE, E. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 241–248, 2013.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARS, J.-P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; BASTUJI, B. G.; LETESSON, J.-J. From the discovery of the Malta fever 's agent to the discovery of a marine mammal reservoir , brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*, v. 36, p. 313–326, 2005.

GONZÁLEZ, G. M. F.; GUTIÉRREZ, H. J. L.; LEÓN, V. H.; ARELLANO, R. B.; PALOMARES, R. G.; RUIZ, H. H.; DÍAZ- APARICIO, E. Detección de *Brucella abortus* en leche fresca y queso crema de vaca en cuatro regiones económicas del estado de Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas*, v. 12, n. 1, p. 83–86, 2017.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, v. 6946, n. 98, p. 751–761, 1997.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: FOX; MCSWEENEY; COGAN; GUINEE (Ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3 rd Ed. Chapman & Hall, London: Elsevier B.V., 2004. 1p. 257–302.

GULBAZ, G.; KAMBER, U. The Detection of *Brucella* bacteria with PCR and bacteriological method in raw Milk and some of the dairy products which are consumed in Kars. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, v. 73, n. 1, p. 197–198, 2016.

GUZMÁN- HERNÁNDEZ, R. L.; HERNÁNDEZ-VELEZ, R. M.; MORALES-ESTRADA, A. I.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; LÓPEZ-MERINO, A.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. Aislamiento e identificación de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp ., y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del golfo de México. *Revista Científica, FCV-LUZ I*, v. XXVI, n. 5, p. 324–331, 2016.

GUZMÁN-HERNÁNDEZ, R. L.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A.; ÁVILA-CALDERÓN, E. D.; MORALES-GARCÍA, M. R. Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Revista Chilena de Infectología*, v. 33, n. 6, p. 1–10, 2016.

GUZMÁN-VERRI, C.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; MORALES, J.-A.; BAQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, n. February, p. 1–22, 2012.

GYURANECZ, M.; ERDELYI, K.; MAKRAI, L.; FODOR, L.; SZEPE, B.; MESZAROS, A. R.; DAN, A.; DENCZO, L.; FASSANG, E.; SZEREDI, L. Brucellosis of the European brown hare (*Lepus europaeus*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 145, n. 1, p. 1–5, 2011.

- HAMDY, M. E. R.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *The Veterinary Journal*, v. 163, n. 3, p. 299–305, 2002.
- HEISCH, R.; COOKE, E. R.; HARVEY, A. E.; SOUZA, F. The isolation of *Brucella suis* in rodents in Kenya. *East African Medical Journal*, v. 40, n. 3, p. 132–133, 1963.
- HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 455–459, 2005.
- HOLST, B.; LÖFQVIST, K.; ERNHOLM, L.; ELD, K.; CEDERSMYG, M.; HALLGREN, G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 54, n. 1, p. 18, 2012.
- HORROCKS, W. H. Preliminary note on goats as a means of propagation of mediterranean fever. *Proceedings of The Royal Society*, v. 76, p. 378–384, 1905.
- HUBÁLEK, Z.; SCHOLZ, H. C.; SEDLÁČ, I. Brucellosis of the Common Vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 7, n. 4, 2007.
- IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Bulletin of the International Dairy Federation* 489/2017. Disponível em: <<https://store.fil-idf.org/wp-content/uploads/2017/10/2017WDSs-preview.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção Pecuária Municipal*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2016/>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- IOR, D. D.; CHUKWU, C. C. Prevalence of *Brucella* antibodies in marketed cow milk in Benue State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 28, p. 1752–1757, 2015.
- JIA, P.; JOYNER, A. Human brucellosis occurrences in inner mongolia, China: A spatio-temporal distribution and ecological niche modeling approach. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2015.
- JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M. P.; ITURRALDE, M.; ARIAS, M. A.; PARDO, J.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S. The new strains *Brucella inopinata* BO1 and *Brucella* species 83-210 behave biologically like classic infectious *Brucella* species and cause death in murine models of infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 3, p. 467–472, 2014.
- JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, v. 25, n. 6, p. 745–761, 2008.
- KAMWINE, M.; ORIKIRIZA, P.; TASEERA, K.; IRAMIOT, J. S.; OJUKA, P.; IKIRIZA, S.; ATWEBEMBEIRE, J.; OTIENO, D.; TWESHENGYEREZE, S.; MWANGA-AMUMPAIRE, J.; BAZIRA, J.; BOUM, Y. Prevalence of antibodies to *Brucella* species in commercial raw bovine milk in Southwestern Uganda. *BMC Research Notes*, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2017.
- KARA, R.; AKKAYA, L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarajisar, Turkey. *British Journal of Dairy Sciences*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2013.
- KARAGIANNIS, I.; MELLOU, K.; GKOLFINOPOULOU, K.; DOUGAS, G.; THEOCHAROPOULOS, G.; VOURVIDIS, D.; ELLINAS, D.; SOTOLIDOU, M.; PAPANIMITRIOU, T.; VOROU, R. Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece,

2008. *Eurosurveillance*, v. 17, n. 11, p. 3–6, 2012.

KASIMOGLU, A. Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kirikkale. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 109, n. 7, p. 324–326, 2002.

KATO, Y.; MASUDA, G.; ITODA, I.; IMAMURA, A.; AJISAWA, A.; NEGISHI, M. Brucellosis in a returned traveler and his wife: Probable person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Journal of Travel Medicine*, v. 14, n. 5, p. 343–345, 2007.

KHALED, M. E.-K.; ESSAM, M. E. Control of organisms during manufacturing of acid cheese using some organic acids. *Assiut Veterinary Medical Journal*, v. 61, n. 147, p. 73–79, 2015.

KIMURA, M.; UNE, Y.; SUZUKI, M.; PARK, E.-S.; IMAOKA, K.; MORIKAWA, S. Isolation of *Brucella inopinata*-Like Bacteria from White's and Denny's Tree Frogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 17, n. 5, p. 297–302, 2017.

KONG, W. Brucellosis infection increasing in Southern China. *European Journal of Internal Medicine*, n. March, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953620518301006>>.

KRONENWETT, F. R.; LEAR, S. A.; METZGER, H. J. Thermal Death Time Studies of *Brucella abortus* in Milk. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 11, p. 1291–1302, 1954.

KRÜGER, N.-J.; BUHLER, C.; IWOB, A. N.; HUBER, I.; ELLERBROEK, L.; APPEL, B.; STINGL, K. “Limits of control”--crucial parameters for a reliable quantification of viable campylobacter by real-time PCR. *PloS one*, v. 9, n. 2, p. e88108, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3914927&tool=pmcentrez&render type=abstract>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

KUPLULU, O.; SARIMEHMETOGLU, B. Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. *Food Control*, v. 15, n. 7, p. 511–514, out. 2004.

KUZDAS, C. D.; MORSE, S. The survival of *Brucella abortus*, U.S.D.A. strain 2308, under controlled conditions in nature. *Cornell Veterinarian*, v. 44, n. 2, p. 216–228, 1953.

LAGE, A. P.; POESTE, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina : uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 3, p. 202–212, 2008.

LAI, S.; ZHOU, H.; XIONG, W.; GILBERT, M.; HUANG, Z.; YU, J.; YIN, W.; WANG, L.; CHEN, Q.; LI, Y.; MU, D.; ZENG, L.; REN, X.; GENG, M.; ZHANG, Z.; CUI, B.; LI, T.; WANG, D.; SUN, Q.; WARDROP, N. A.; TATEM, A. J.; YU, H. Changing Epidemiology of Human Brucellosis, China, 1955–2014. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 2, p. 184–194, 2017.

LANGER, A. J.; AYERS, T.; GRASS, J.; LYNCH, M.; ANGULO, F. J.; MAHON, B. E. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws - United States, 1993-2006. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 385–392, 2012.

LAVAL, E. Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, v. 33, n. 4, p. 1–5, 2006.

LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 383–398, 2001.

LAWINSKY, M. L. D. J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. D. R.; FARIA, N. D. C.;

CAVALCANTE, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 4, p. 75–84, dez. 2010.

LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; GUILLOTEAU, L. a; VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology*, v. 6, p. 9, 2006.

LEAMY, R. J.; HEISS, S. N.; ROCHE, E. The Impact of Consumer Motivations and Sources of Information on Unpasteurized Milk Consumption in Vermont , 2013. *Food Protection Trends*, v. 34, n. 4, p. 216–225, 2014.

LEONG, K. N.; CHOW, T. S.; WONG, P. S.; HAMZAH, S. H.; AHMAD, N.; CH'NG, C. C. Case report: Outbreak of human brucellosis from consumption of raw goats' milk in Penang, Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 3, p. 539–541, 2015.

LPSN. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: Genus Brucella*. Disponível em: <[www.bacterio.net/brucella.html](http://www.bacterio.net/brucella.html)>. Acesso em: 13 mar. 2018.

LUCERO, N. E.; AYALA, S. M.; ESCOBAR, G. I.; JACOB, N. R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 4, p. 496–503, 2008.

LUCERO, N. E.; ESCOBAR, G. I.; AYALA, S. M.; JACOB, N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 457–461, 2005.

LUNA-MARTÍNEZ, J. E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 19–30, 20 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414130>>.

LUND, B. M.; O'BRIEN, S. J. The Occurrence and Prevention of Foodborne Disease in Vulnerable People. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 9, 2011.

MAILLES, A.; RAUTUREAU, S.; LE HORGNE, J. M.; POIGNET-LEROUX, B.; D'ARNOUX, C.; DENNETIÈRE, G.; FAURE, M.; LAVIGNE, J. P.; BRU, J. P.; GARIN-BASTUJI, B. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Eurosurveillance*, v. 17, n. 30, p. 9–11, 2012.

MANTUR, B. G.; AMARNATH, S. A. Brucellosis in India – a review. *Journal Bioscience*, v. 33, p. 539–547, 2008.

MCDONALD, W. L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P.; TAYLOR, T.; SWINGLER, J.; DAWSON, C. E.; WHATMORE, A. M.; STUBBERFIELD, E.; PERRETT, L. L.; SIMMONS, G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4363–4370, 2006.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 2–3, p. 127–144, 2004.

MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L.; CHEVILL, N. F. Effect of nursing on *Brucella abortus* infection of mammary glands of goats. *Veterinary Pathology*, v. 26, n. 1, p. 369–375, 1989.

MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Veterinary Pathology*, v. 26, p. 357–368, 1989a.

MEADOR, V. P.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of *Brucella abortus* Infection of the Mammary Gland and Supramammary Lymph Node of the Goat. *Veterinary Pathology*, v. 26, n. 5, p. 357–368, 1989b.

MEGERSA, B.; BIFFA, D.; ABUNNA, F.; REGASSA, A.; GODFROID, J.; SKJERVE, E. Seroprevalence of brucellosis and its contribution to abortion in cattle, camel, and goat kept under pastoral management in Borana, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, v. 43, n. 3, p. 651–656, 2011.

MEGGED, O.; CHAZAN, B.; GANEM, A.; AYOUB, A.; YANOVSKAY, A.; SAKRAN, W.; MIRON, D.; DROR-COHEN, A.; KENNES, Y.; BERDENSTEIN, S.; GLIKMAN, D. Brucellosis outbreak in children and adults in two areas in Israel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 31–34, 2016.

MEMISH, Z. a; BALKHY, H. H. Brucellosis and international travel. *Journal of Travel Medicine*, v. 11, n. 1, p. 49–55, 2004.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F.; LÓPEZ-MERINO, A.; SUÁREZ-GÜEMES, F. *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 12, p. 1257–61, dez. 2011.

MÉNDEZ-LOZANO, M.; RODRÍGUEZ-REYES, E. J.; SÁNCHEZ-ZAMORANO, L. M. Brucellosis, una zoonosis presente en la población: Estudio de series de tiempo en México. *Salud Publica de Mexico*, v. 57, n. 6, p. 519–527, 2015.

MÉNDEZ MARTÍNEZ, C.; PÁEZ JIMÉNEZ, A.; CORTÉS-BLANCO, M.; SALMORAL CHAMIZO, E.; MOHEDANO MOHEDANO, E.; PLATA, C.; VARO BAENA, A.; MARTÍNEZ NAVARRO, F. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalucía (Spain), January - March 2002. *Euro surveillance*, v. 8, n. 7, p. 164–168, 2003.

MEYER, K. F.; SHAW, E. B. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*: Studies on the genus *Brucella* Nov. Gen. I. *Oxford Journal*, v. 27, n. 3, p. 173–184, 1920.

MINHARRO, S. B. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil. *Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais*, 2009.

MINHARRO, S.; SILVA MOL, J. P.; DORNELES, E. M. S.; PAULETTI, R. B.; NEUBAUER, H.; MELZER, F.; POESTER, F. P.; DASSO, M. G.; PINHEIRO, E. S.; SOARES FILHO, P. M.; SANTOS, R. L.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Biotyping and genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 1977 to 2008. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Sistema de informações hospitalares do SIH/SUS*. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

MIRANDA, K. L.; POESTER, F. P.; DORNELES, E. M. S.; RESENDE, T. M.; VAZ, A. K.; FERRAZ, S. M.; LAGE, A. P. *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. *Acta Tropica*, v. 160, p. 58–61, 2016.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase chain reaction ( PCR ). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 17–22, 2007.

- MOR, S. M.; WIETHOELTER, A. K.; MASSEY, P. D.; ROBSON, J.; WILKS, K.; HUTCHINSON, P. Pigs, pooches and pasteurisation: The changing face of brucellosis in Australia. *The Royal Australian College of General Practitioner*, v. 47, n. 3, p. 99–103, 2018.
- MORALES-GARCÍA, M. R.; LÓPEZ-MÉNDEZ, J.; PLESS, R.; GARCÍA-MORALES, E.; KOSANKE, H.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; BEDI, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N.; JIMÉNEZ-ROJAS, L.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico - a comprehensive investigation. *Veterinaria Italiana*, v. 51, n. 3, p. 185–190, 2015.
- MORALES OTERO, P. *Studies of Brucella infection in Puerto Rico, San Juan*, 1948.
- MORE, S. J.; RADUNZ, B.; GLANVILLE, R. J. Review: Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. *Veterinary Record*, v. 177, n. 9, p. 224–232, 2015.
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 31–38, 2002.
- MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–18, 2014.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 209–227, 2002.
- MORGAN, W. J. B.; MCDIARMID, A. The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle. *Research in Veterinary Science*, p. 53–56, 1960.
- MOTA, A. L. A. de A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GRISI-FILHO, J. H. H.; TELLES, EVELISE OLIVEIRA GONÇALVES, V. S. P. Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. *Acta Tropica*, v. 164, p. 226–232, 2016.
- NENOVA, R.; TOMOVA, I.; SAPAREVSKA, R.; KANTARDJIEV, T. A new outbreak of brucellosis in Bulgaria detected in July 2015 – preliminary report. *Eurosurveillance*, v. 20, n. 39, p. 1–4, 2015.
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 5–9, 2002.
- NORMAN, F. F.; MONGE-MAILLO, B.; CHAMORRO-TOJEIRO, S.; PÉREZ-MOLINA, J.-A.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Imported brucellosis: A case series and literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 14, n. 3, p. 182–199, 2016.
- OCAMPO-SOSA, A. A.; AGUERO-BALBÍN, J.; GARCÍA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, v. 110, p. 41–51, 2005.
- OLIVARES, R.; VIDAL, P.; SOTOMAYOR, C.; NORAMBUENA, M.; LUPPI, M.; SILVA, F.; CIFUENTES, M. Brucellosis en Chile: Descripción de una serie de 13 casos. *Revista Chilena de Infectología*, v. 34, n. 3, p. 243–247, 2017.
- OLIVEIRA, M. S.; DORNELES, E. M. S.; SOARES, P. M. F.; FONSECA, A. A.; ORZIL, L.; DE SOUZA, P. G.; LAGE, A. P. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 2009–2013. *Acta Tropica*, v. 166, p. 106–113, 2017.

- OLSEN, S.; TATUM, F. Bovine brucellosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v. 26, n. 1, p. 15–27, table of contents, mar. 2010.
- OMER, M. M.; ABDELAZIZ, A. A.; ABUSALAB, M. A. S.; AHMED, A. M. Survey of brucellosis among sheep, goats, camel and cattle in Kassala Area, Eastern Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 6, n. 5, p. 635–637, 2007.
- OSTERMAN, B.; MORIYÓN, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 1173–1175, 2006.
- PACHECO, W. A.; GENOVEZ, M. E.; POZZI, C. R.; SILVA, L. M. P.; AZEVEDO, S. S.; DID, C. C.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S.; CASTRO, V.; MIYASHIRO, S.; GAMBARINI, M. L. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 594–601, 2012.
- PALANDUZ, A.; PALANDUZ, Ş.; GÜLER, K.; GÜLER, N. Brucellosis in a mother and her young infant: Probable transmission by breast milk. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 55–56, 2000.
- PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, v. 63, n. 19–20, p. 2229–36, out. 2006a.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006b.
- PAULA, C. L.; MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C. M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF, S. D.; MEGID, J. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 82, p. 1–5, 2015.
- PAULETTI, R. B.; STYNEN, A. P. R.; DA SILVA MOL, J. P.; DORNELES, E. M. S.; ALVES, T. M.; DE SOUSA MOURA SOUTO, M.; MINHARRO, S.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Reduced susceptibility to rifampicin and resistance to multiple antimicrobial agents among *Brucella abortus* isolates from cattle in Brazil. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–11, 2015.
- PILO, C.; TEDDE, M. T.; ORRÙ, G.; ADDIS, G.; LICIARDI, M. *Brucella suis* infection in domestic pigs in Sardinia (Italy). *Epidemiology and Infection*, v. 143, n. 10, p. 2170–7, 2015.
- PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G.; COURAULT, M.; MUSSET, D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait*, v. 68, n. 2, p. 115–120, 1988.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.
- POULOU, A.; MARKOU, F.; XIPOLITOS, I.; SKANDALAKIS, P. N. A rare case of *Brucella melitensis* infection in an obstetrician during the delivery of a transplacentally infected infant. *Journal of Infection*, v. 53, n. 1, p. 39–41, 2006.
- QUANCE, C.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; STUBER, T.; BRIGNOLE, T.; DEBESS, E. E.; BOYD, L.; LEAMASTER, B.; TILLER, R.; DRAPER, J.; HUMPHREY, S.; ERDMAN, M. M. Identification of source of *Brucella suis* infection in human by using whole-genome sequencing, United States and Tonga. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 79–82, 2016.
- RAGAN, V. E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication

- program in the United States. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 11–18, 2002.
- RAMAMOORTHY, S.; WOLDEMESKEL, M.; LIGETT, A.; SNIDER, R.; COBB, R.; RAJEEV, S. *Brucella suis* Infection in Dogs, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 12, p. 2386–2387, 2011.
- RAMOS, J. M.; BERNAL, E.; ESGUEVILLAS, T.; LOPEZ-GARCIA, P.; GAZTAMBIDE, M. S.; GUTIERREZ, F. Non-imported brucellosis outbreak from unpasteurized raw milk in Moroccan immigrants in Spain. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 11, p. 1552–5, 2008.
- REFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the near East region. *Veterinary Microbiology Microbial*, v. 90, n. 1–4, p. 81–110, 2002.
- RENUKARADHYA, G. J.; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 183–195, 2002.
- RHYAN, J. C.; NOL, P.; QUANCE, C.; GERTONSON, A.; BELFRAGE, J.; HARRIS, L.; STRAKA, K.; ROBBE-AUSTERMAN, S. Transmission of brucellosis from elk to cattle and bison, Greater Yellowstone Area, USA, 2002-2012. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 12, p. 1992–1995, 2013.
- RIVERA, S. A.; RAMÍREZ, M. C.; LOPETEGUI, I. P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 45–53, 2002.
- ROMÁN, K.; CASTILLO, R.; GILMAN, R. H.; CALDERÓN, M.; VIVAR, A.; CÉSPEDES, M.; SMITS, H. L.; MELÉNDEZ, P.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; MAVES, R. C.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M.; SAITO, M. A foodborne outbreak of brucellosis at a police station cafeteria, Lima, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 3, p. 552–558, 2013.
- RÓNAI, Z.; KREIZINGER, Z.; DÁN, Á.; DREES, K.; FOSTER, J. T.; BÁNYAI, K.; MARTON, S.; SZEREDI, L.; JÁNOSI, S.; GYURANECZ, M. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. *BMC Veterinary Research*, p. 4–9, 2015.
- ROWE, M. T. Problems with dairy products. *Encyclopedia of Food Microbiology*, v. 1, p. 340–343, 2014.
- SAMAHA, H. A. M. Viability of *Brucella melitensis* biovar 3 , in milk and some dairy products. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, v. 17, n. 2, p. 179–185, 2008.
- SAMAHA, H.; AL-ROWAILY, M.; KHOUDAIR, R. M.; ASHOUR, H. M. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. 1916–1918, 2008.
- SAMARTINO, L. E. Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 71–80, 2002.
- SAMARTINO, L. E.; FORT, M.; GREGORET, R.; SCHURIG, G. G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calthood vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 3–4, p. 193–199, 2000.
- SANTIAGO-RODRIGUEZ, M. D.; DIAZ-APARICIO, E.; ARELLANO-REYNOSO, B.; GARCIA-LOBO, J. M.; GIMENO, M.; PALOMARES-RESENDIZ, E. G.; HERNANDEZ-CASTRO, R. Survival of *Brucella abortus* aqpX Mutant in Fresh and Ripened Cheeses. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 12, n. 2, p. 1–6, 2015.
- SANTOS, H. P.; TEIXEIRA, W. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; PEREIRA, H. M.; OLIVEIRA, R.



A.; NEGREIROS, R. C.; SOARES FILHO, P. M.; SANTANA, S. S.; CASTRO, R. S. Brucelose bovina e humana diagnosticada em matadouro municipal de São Luís - MA, Brasil. *Ciência Veterinária Tropical*, v. 10, n. 2/3, p. 86–94, 2007.

SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M.; PAIXÃO, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 759–764, 2013.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 9, n. 2, p. 153–156, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; FLÈCHE, P. Le; WHATMORE, A. M.; DAHOUK, S. Al; KRÜGER, M.; LODRI, C.; PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1317, 2008a.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; HEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 2, p. 375–382, 2008b.

SCHOLZ, H. C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE KUMAR, B. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 801–808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; DAHOUK, S. Al; HAMMERL, J. A.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; VERGNAUD, G.; WITTE, A.; AISTLEITNER, K.; HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. Nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 2090–2098, 2016.

SCHROEDER, E. C.; COTTON, W. E. The *Bacillus* of infectious abortion found in milk. *U. S. Department of Agriculture. Twenty-eighth annual report of the bureau of animal industry for the year 1911*, p. 139–146, 1913.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3–4, p. 392–8, 2010.

SHIMOL, S. Ben; DUKHAN, L.; BELMAKER, I.; BARDENSTEIN, S.; SIBIRSKY, D.; BARRETT, C.; GREENBERG, D. Human brucellosis outbreak acquired through camel milk ingestion in Southern Israel. *Israel Medical Association Journal*, v. 14, n. 8, p. 475–478, 2012.

SMID, E. J.; LACROIX, C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, n. 2, p. 148–154, 2013.

SMITS, H. L.; KADRI, S. M. Brucellosis in India: A deceptive infectious disease. *Indian Journal of Medical Research*, v. 122, n. 5, p. 375–384, 2005.

SOHN, A.; PROBERT, W.; CA, G.; GUPTA, N.; BOLLEN, A.; WONG, J.; EM, G.; MCDONALD, W. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine

mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 4, p. 485–488, 2003.

SOLER-LLORENS, P. F.; QUANCE, C. R.; LAWHON, S. D.; STUBER, T. P.; EDWARDS, J. F.; FICHT, T. A.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; O'CALLAGHAN, D.; KERIEL, A. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical *Brucellae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, n. September, p. 1–16, 2016.

SOTO-VARELA, Z. E.; GUTIÉRREZ, C. G.; MOYA, Y. De; MATTOS, R.; VILLARREAL, H. J. B.-A. J. L. Detección molecular de *Salmonella* spp, *Listeria* spp y *Brucella* spp en queso fresco artesanal comercializado en la ciudad de Barranquilla: un estudio piloto. *Biomédica*, v. 33, n. 4, p. 24, 2013.

STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, P. H. F. da; PAULA, J. C. J. de; TELLES, E. O. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3743, 2016.

STECCHINI, M. L.; SARAIS, I.; BERTOLDI, M. de. The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 99–109, 1991.

STOENNER, H.; LACKMAN, D. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American Journal of Veterinary Research*, v. 18, n. 69, p. 947–9, 1957.

SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; BARQUERO-CALVO, E.; CHACÓN-DÍAZ, C.; VÍQUEZ-RUIZ, E.; ROJAS-CAMPOS, N.; BAKER, K. S.; OVIEDO-SÁNCHEZ, G.; AMUY, E.; CHAVES-OLARTE, E.; THOMSON, N. R.; MORENO, E.; GUZMÁN-VERRI, C. *Brucella neotomae* infection in humans, Costa rica. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 6, p. 997–1000, 2017.

TAE, H.; SHALLOM, S.; SETTLAGE, R.; HAWKINS, G.; ADAMS, L.; GARNER, H. Complete Genome Sequence of *Brucella suis* VBI22, Isolated from Bovine Milk. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 4, p. 910, 2012.

TALESKI, V.; ZERVA, L.; KANTARDJIEV, T.; CVETNIC, Z. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 147–155, 2002.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S16–S28, 2010.

TENÓRIO, T. G. S.; MELO, L. E. H.; MOTA, R. A.; FERNANDES, C. H. C.; SÁ, L. M.; SOUTO, R. J. C.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Pesquisa de fatores de risco para a brucelose humana associados à presença de brucelose bovina no município de Correntes, estado de Pernambuco, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 75, n. 4, p. 415–421, 2008.

TILLER, R. V.; GEE, J. E.; LONSWAY, D. R.; GRIBBLE, S.; BELL, S. C.; JENNISON, A. V.; BATES, J.; COULTER, C.; HOFFMASTER, A. R.; DE, B. K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*, v. 10, 2010.

- TZANEVA, V.; IVANOVA, S.; GEORGIEVA, M.; TASHEVA, E. Investigation of the spread of brucellosis among human and animal populations in southeastern Bulgaria, 2007. *Eurosurveillance*, v. 14, n. 17, p. 1–6, 2007.
- UZAL, F. A.; SAMARTINO, L.; SCHURIG, G.; CARRASCO, A.; NIELSEN, K.; CABRERA, R. F.; TADDEO, H. R. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Veterinary Research Communications*, v. 24, n. 3, p. 143–151, 2000.
- VARGAS, F. J. O. Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 39–44, 2002.
- VASSALLO, D. J. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, v. 138, n. 3, p. 140–50, 1992.
- VERGER, J.-M.; GRIMONT, F.; GMONT, P. a. D.; GRAYON, M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 35, n. 3, p. 292–295, 1985.
- VERGER, J. M. Comparaison des doses infectieuses 50P.100 (DI 50) de *Brucella melitensis* inoculée par les voies conjonctivale, intragastrique et intrapéritonéale a la souris. *Annales de Recherches Vétérinaires*, v. 2, n. 2, p. 185–196, 1991.
- VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, v. 50, p. 32–44, 2015.
- VIGEANT, P.; MENDELSON, J.; MILLER, M. A. Human to human transmission of *Brucella melitensis*. *The Canadian journal of infectious diseases. Journal Canadien des Maladies Infectieuses*, v. 6, n. 3, p. 153–5, 1995.
- VILLALOBOS-VINDAS, J. M.; AMUY, E.; BARQUERO-CALVO, E.; ROJAS, N.; CHACÓN-DÍAZ, C.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMAN-VERRI, C.; MORENO, E. Brucellosis caused by the wood rat pathogen *Brucella neotomae*: Two case reports. *Journal of Medical Case Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–4, 2017.
- VINCENT, P.; JOUBERT, L.; PRAVE, M. Two cases of *Brucella* infection in personnel accidentally self-inoculated with B19 vaccine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, v. 43, p. 89–97, 1970.
- WALLACH, J. C.; MIGUEL, S. E.; BALDI, P. C.; GUARNERA, E.; GOLDBAUM, F. a.; FOSSATI, C. a. Urban outbreak of a *Brucella melitensis* infection in an Argentine family: clinical and diagnostic aspects. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 49–56, 1994.
- WANG, L.; LI, P.; ZHANG, Z.; CHEN, Q.; AGUILAR, Z. P.; XU, H.; YANG, L.; XU, F.; LAI, W.; XIONG, Y.; WEI, H. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. *Food Control*, v. 36, n. 1, p. 119–125, 2014.
- WARETH, G.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; NEUBAUER, H.; ROESLER, U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 10, p. 1339–1343, jan. 2014.
- WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H. ; DICK JR, E. J.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. Full

taxonomic description of the proposed eleventh *Brucella* species, *Brucella papionis* sp. nov. isolated from Baboons. In: Brucellosis 2014 International Research Conference, Berlin, *Anais...*2014.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Brucellosis*. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D13938.PDF>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Disease Information*. Disponível em: <[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines)>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v. 12, n. 2–3, p. 91–109, 2002.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 140, n. 2–3, p. 149–157, 2009.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, v. 2, n. 1, p. 48, 2012.

YANG, Y.; XU, F.; XU, H.; AGUILAR, Z. P.; NIU, R.; YUAN, Y.; SUN, J.; YOU, X. et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 418–424, 2013.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, v. 63, p. 201–215, 2016.

ZAMMIT, T. A preliminary note on the susceptibility of goats to malta fever. *Proceedings of the Royal Society*, v. 76B, p. 377–378, 1905.

ZEINHOM, M. M. A.; ABDEL-LATEF, G. K. Public health risk of some milk borne pathogens. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 3, n. 3, p. 209–215, 2014.

ZHANG, Z.; LIU, W.; XU, H.; WEI, H. Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. *Journal of Dairy Science*, p. 1625–1633, 2015.

ZHONG, Z.; YU, S.; WANG, X.; DONG, S.; XU, J.; WANG, Y.; CHEN, Z.; REN, Z.; PENG, G. International Journal of Infectious Diseases Human brucellosis in the People's Republic of China during 2005 – 2010. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 289–292, 2013.

ZOTTOLA, E. A.; SMITH, L. B. Pathogens in cheese. *Food Microbiology*, v. 8, p. 171–182, 1991.

ZÚÑIGA ESTRADA, A.; MOTA DE LA GARZA, L.; SÁNCHEZ MENDOZA, M.; SANTOS LÓPEZ, E. M.; FILARDO KERSTUPP, S.; LÓPEZ MERINO, A. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 47, n. 3–4, p. 88–91, 2005.

## 5. CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS CONTRA *Brucella abortus*

### 5.1. RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar (i) métodos para estudar a atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas (BAL) contra *Brucella abortus* e (ii) o efeito antagonista de BAL na viabilidade deste patógeno. Um total de 18 amostras de BAL (*Lactobacillus plantarum* (11), *Pediococcus acidilactici* (1), *Lactobacillus rhamnosus* (4) e *Lactobacillus brevis* (2)), isoladas de queijos Minas artesanais, produzidos em três regiões (Canastra, Campos das Vertentes e Araxá) do estado de Minas Gerais, Brasil, foram testadas quanto à sua atividade antimicrobiana contra *B. abortus* por três métodos: *spot-on-the-lawn*, ensaio de difusão em ágar e atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas. Como resultados, obtivemos que nenhuma das amostras de BAL testada foi capaz de inibir *B. abortus* nos ensaios *spot-on-the-lawn* e difusão em ágar. Os sobrenadantes produzidos pelas BAL apresentaram pH ácido, com intensidade dependendo da amostra e do crescimento bacteriano, e foram capazes de inibir o crescimento de *B. abortus* no ensaio de sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas. No entanto, quando os sobrenadantes foram neutralizados (pH 7,0) o crescimento de *B. abortus* não foi suprimido. Os resultados mostram (i) que a melhor técnica para estudar o antagonismo *in vitro* de BAL contra *B. abortus* foi o ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas e (ii) que o crescimento de *B. abortus* pode ser inibido por amostras de BAL.

**Palavras-chave:** queijos produzidos com leite cru; microbiota do leite; brucelose; inocuidade alimentar; bactérias ácido-láticas

### 5.2. ABSTRACT

The aims of this study were (i) to evaluate methods for studying *in vitro* antimicrobial activity of lactic acid bacteria (LAB) against *Brucella abortus* and (ii) to evaluate the antagonistic effect of LAB on the viability of this pathogen. A total of 18 LAB strains (*Lactobacillus plantarum* n = 11, *Pediococcus acidilactici* n = 1, *Lactobacillus rhamnosus* n = 4 and *Lactobacillus brevis* n = 2, isolated from Minas artisanal cheeses, produced in three regions (Canastra, Campos das Vertentes and Araxá) of Minas Gerais State, Brazil, were tested for their antimicrobial activity against *B. abortus* by three methods: spot-on-the-lawn, agar well diffusion assay and antagonistic activity of the culture supernatants. None of the tested LAB strains was able to inhibit the *B. abortus* in the spot-on-the-lawn and agar well diffusion assays. The supernatants produced by LAB had an acidic pH, with intensity depending on the bacterial growth and strain, and were able to inhibit the growth of *B. abortus*. In contrast, pH-neutralized (pH 7.0) LAB supernatants did not suppress the growth of *B. abortus*. The results show (i) that the best technique to study the *in vitro* antagonism of LAB against *B. abortus* was the antagonistic activity of the culture supernatants of lactic acid bacteria assay, and (ii) that the growth of *B. abortus* can be inhibited by LAB strains.

**Keywords:** raw milk cheese; milk microbiota; brucellosis, food security, lactic acid bacteria

### 5.3. INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Brucella* são patógenos responsáveis por perdas econômicas na pecuária, e também com importância em saúde pública, associado principalmente ao consumo de leite cru e produtos lácteos produzidos com leite cru (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Em animais infectados, *B. abortus* pode ser eliminado no leite de forma contínua ou intermitente, em concentrações de  $10^1$  a  $10^6$  UFC/mL (CARPENTER; BOAK, 1928; DAVIES; CASEY, 1973; XAVIER et al., 2009). Desta forma, o patógeno tem sido detectado no leite cru, queijos frescos e outros produtos lácteos disponíveis no mercado em vários países, com envolvimento em diversos casos de doenças transmitidas por alimentos para seres humanos (HAMDY; AMIN, 2002; CAPUANO et al., 2013; KARA; AKKAYA, 2013; WARETH et al., 2014).

A brucelose tem distribuição mundial com cerca de 500.000 novos casos de brucelose humana relatados anualmente (PAPPAS et al., 2006). A doença é importante principalmente em países em desenvolvimento devido a falhas na vigilância e nas medidas de controle da doença (GODFROID et al., 2013), mas ainda possui importância em países desenvolvidos (PAPPAS et al., 2006). No Brasil, apesar da existência do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) desde 2001 (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002), a doença possui distribuição heterogênea, com alta prevalência em alguns estados e muito baixas em outros (FERREIRA NETO et al., 2016). *Brucella* spp. já foi identificada em leite cru e queijos produzidos com leite cru no Brasil e pode ser um risco para a saúde pública (MIYASHIRO et al., 2007; DE PAULA et al., 2015).

Queijos artesanais são produzidos com leite cru e representam uma proporção significativa dos produtos lácteos produzidos, contribuindo com a preservação da identidade sociocultural e possui grande importância econômica em várias regiões do mundo, especialmente na América Latina (MENEZES, 2011). O queijo Minas artesanal é produzido no Brasil e possui uma rica microbiota derivada de leite cru e do fermento endógeno utilizado na fabricação dos queijos (MARTINS et al., 2015). As contagens de bactérias ácido-láticas (BAL) no queijo Minas artesanal variaram de  $10^5$  a  $10^9$  UFC / g de queijo ao longo do período de maturação e são parcialmente responsáveis pelo desenvolvimento de suas características sensoriais peculiares (RESENDE et al., 2011; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016).

As BAL são essenciais para a segurança do queijo artesanal, uma vez que competem por nutrientes com outros microrganismos e podem sintetizar muitos compostos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, o que pode inibir o crescimento de bactérias patogênicas (ROSS; MORGAN; HILL, 2002; QUIGLEY et al., 2013). A inibição do crescimento de patógenos por BAL pode ser avaliada por ensaios de antagonismo *in vitro*, recomendados pela Organização Mundial de Saúde e pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2002) para a avaliação de probióticos em alimentos.

A eficácia das BAL na preservação do leite e produtos lácteos por sua atividade antagonista tem sido demonstrada para alguns patógenos transmitidos por alimentos, com importância para a saúde pública, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (MENÉNDEZ et al., 2001; DAL BELLO et al., 2012; ANDRADE et al., 2014). No entanto, embora alguns dados tenham demonstrado que BAL é capaz de reduzir o pH do leite e produtos lácteos, e assim influenciar no tempo de sobrevivência de *Brucella* spp. (KUZDAS; MORSE, 1953; DAVIES; CASEY, 1973; EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990), não há estudo que demonstre a atividade antagonista das BAL contra bactérias do gênero *Brucella*.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar (i) diferentes métodos para o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* de BAL contra *Brucella abortus* e (ii) o efeito antagonista de BAL na viabilidade deste patógeno.

## 5.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As amostras de BAL usadas no presente estudo foram isoladas de queijos Minas artesanais com diferentes períodos de maturação, produzidos em propriedades localizadas nas regiões de Serra da Canastra, Araxá e Campo das Vertentes, Minas Gerais, Brasil (RESENDE et al., 2011; SALES, 2015; LUIZ et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2017) e foram identificadas por coloração de Gram, catalase e sequenciamento do genes 16S rRNA (CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016; RESENDE et al., 2011; SALES, 2015; SANT'ANNA et al., 2017).

Foram selecionadas 18 amostras de BAL (Tabela 3. 1), seis de cada região produtora de queijo Minas artesanal, com base no desempenho no antagonismo pelo teste *spot-on-the-lawn* contra

*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enterica* sorovar. Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Shigella flexneri* ATCC 25875 (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA et al., 2017).

**Tabela 3. 1.** Amostras de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal produzidos nas regiões da Serra da Canastra, Araxá e Campo das Vertentes usadas nos ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana contra *Brucella abortus*.

Amostras de BAL	Espécies	Referência do isolamento
<b>Campos das Vertentes</b>		SANT'ANNA et al. (2017)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
26	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
56	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<b>Araxá</b>		LUIZ et al. (2016); SALES (2015)
A1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
A6	<i>Lactobacillus brevis</i>	
B206	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
B16	<i>Lactobacillus brevis</i>	
C5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
E5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<b>Serra da Canastra</b>		RESENDE et al. (2011)
B19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
B4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
B7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
B17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
A8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
D8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	

As amostras de BAL foram cultivadas em caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, EUA) a 37 ° C, por 24 h, em condições aeróbicas. Em seguida, preparou-se um inóculo de 10<sup>8</sup> UFC / mL padronizado por espectrofotometria (OD<sub>600</sub>), que foi confirmado retrospectivamente por contagem (MILES; MISRA, 1938) e usado em todos os ensaios *in vitro* de antagonismo.

#### 5.4.2. *Brucella abortus* E CONDIÇÕES DE CULTIVO

*Brucella abortus* amostras de referência 2308 e 544 (ATCC 23448) (POESTER et al., 2006; MIRANDA et al., 2015) e amostra de campo *B. abortus* 2683 (*B. abortus* biovar 3 isolada do leite) (DORNELES et al., 2014) foram utilizadas como bactérias indicadoras nos testes de antagonismo *in vitro*. As amostras de *B. abortus* foram cultivadas em ágar triptose (Difco, Detroit, EUA) a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Inóculo de 100 µL com 10<sup>4</sup> UFC/mL (10<sup>3</sup> UFC), foi padronizado por espectrofotometria (OD<sub>600</sub>) e confirmado retrospectivamente por contagem (MILES; MISRA, 1938) para uso em todos os ensaios.

#### 5.4.3. TESTE DO CRESCIMENTO DE *Brucella abortus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Para avaliar a capacidade de *B. abortus* crescer em diferentes meios, que poderiam ser utilizados nos testes de antagonismo, concentração padronizada (10<sup>3</sup> UFC) de *B. abortus* 2308, 544 e 2683 foi inoculada em 3,5 mL de ágar triptose semi-sólido (0,75% de ágar) a 50 ° C e vertido em placas de petri contendo 20 mL dos seguintes meios: ágar infusão de cérebro coração (BHI) (Oxoid, Cheshire, Inglaterra), ágar BHI suplementado com D-glucose (concentração final de 20 gramas por litro), ágar MRS (Difco, Detroit, EUA), ágar M17 (Difco, Detroit, EUA) e ágar Mueller-

Hinton (Difco, Detroit, EUA). Todas as placas foram incubadas a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h.

O crescimento de *B. abortus* também foi testado em meio líquido. Caldo Triptose (Difco, Detroit, EUA) e caldo MRS (Difco, Detroit, EUA) em diferentes proporções (v / v) 1: 2 (2 mL: 2 mL), 1: 3 (2 mL: 4 mL), 1: 5 (2 mL: 8 mL) foram inoculados com concentração padronizada de *B. abortus* 2308, 544 e 2683.

#### **5.4.4. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS CONTRA *B. abortus***

Três ensaios diferentes foram testados para determinar a atividade antagonista *in vitro* de amostras de BAL contra *B. abortus*: ensaio de antagonismo *spot-on-the-lawn*, ensaio de difusão em ágar e ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas.

*E. coli* ATCC 25922 foi usada como controle susceptível em todos os ensaios e foi crescida em ágar MacConkey (Difco, Detroit, EUA) a 37 ° C por 24 h. Inóculo de 100 µL com 10<sup>4</sup> UFC / mL (10<sup>3</sup> UFC) da suspensão de *E. coli*, padronizado por espectrofotometria (OD<sub>600</sub>) e confirmado retrospectivamente por contagem foi usado em todos os ensaios (MILES; MISRA, 1938).

Todos os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata. Os resultados foram expressos de acordo com o desvio padrão e média entre os experimentos.

##### **5.4.4.1. ENSAIO DE ANTAGONISMO SPOT-ON-THE-LAWN**

O antagonismo de amostras de BAL contra *B. abortus* foi realizado pelo ensaio *Spot-on-the-lawn* (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976). Resumidamente, 10 µL de cada BAL foi inoculado no centro de placas de petri contendo ágar MRS, ágar BHI e ágar BHI acrescido de D-glucose (concentração final de 20 gramas por litro), que foram então incubadas a 37 ° C por 24 h, em aerobiose. Em seguida, os spots de BAL foram inativadas por exposição a 1mL de clorofórmio adicionado a tampa da placa de petri por 30 minutos, seguido pela exposição à luz UV por outros 30 minutos para evaporação do clorofórmio residual. Após a inativação, as placas foram incubadas a 37 ° C por 12 h.

Posteriormente, 3,5 mL de ágar triptose semi-sólido (ágar 0,75%) mantidos a 50 ° C foi inoculado com 100 µL de suspensão padronizada de *B. abortus* 2308, 544 e 2683 ou *E. coli* ATCC 25922 (controle suscetível) e vertidos sobre as placas de petri com os spots de BAL inativados. As placas foram então incubadas a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 h, para *B. abortus* ou a 37 ° C, em aerobiose, por 24 h, para *E. coli* antes de medir o diâmetro do halo de inibição.

##### **5.4.4.2. ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR**

O ensaio de difusão em ágar foi realizado como descrito por (YANG et al., 2012). Um inóculo de 100 µL da suspensão com 10<sup>4</sup> UFC / mL (10<sup>3</sup> UFC) de cada amostra de BAL foi inoculado em 10 mL de caldo MRS e incubado a 37 ° C por 24 h. Posteriormente, as culturas de BAL foram centrifugadas a 14 000 x g por 5 min à temperatura ambiente, os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 µm (Kasvi, Paraná, Brasil) e o pH foi aferido. Os inóculos bacterianos do cultivo de BAL foram confirmados retrospectivamente por contagem (MILES; MISRA, 1938). Um mililitro de cada amostra de *B. abortus* ou *E. coli* ATCC 25922 contendo 10<sup>3</sup> UFC / mL foi inoculado em 15 mL de triptose semi-sólido (ágar 0,75%) ou ágar BHI, mantidos a 50 ° C e depois vertidos sobre uma Placa de Petri (90x15mm). Após a solidificação por 30 minutos, foram cortados três poços de 5 mm de diâmetro no ágar e adicionados a cada poço 35 µL de sobrenadante livre de células de cada amostra de BAL. As placas foram então incubadas a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 h para *B. abortus* ou a 37 ° C, em condições aeróbicas, durante 24h, para *E. coli* ATCC 25922 (controle suscetível) e depois os diâmetros do halo de inibição foram medidos.



#### **5.4.4.3. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS SOBRENADANTES DE CULTURA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS**

A atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de BAL contra *B. abortus* foi realizado como descrito por HUTT et al., (2006) com modificações. Resumidamente, inoculou-se 200 µL de suspensões de 10<sup>4</sup> UFC / mL (10<sup>3</sup> UFC) de cada BAL em 30 mL de caldo MRS e incubou-se a 37 ° C por 24 h. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min à temperatura ambiente, o pH foi aferido. O volume do sobrenadante foi dividido em duas partes de 15 mL e uma das partes foi neutralizada para pH 7,0 ± 0,1 com NaOH (1 M). Ambos os sobrenadantes, com pH ajustado e não ajustado foram filtrados em membrana de 0,22 µm. Os inóculos bacterianos dos cultivos foram confirmados retrospectivamente por contagem (MILES; MISRA, 1938).

Dois mililitros (2,0 mL) de cada sobrenadante de culturas de BAL foi misturado com volumes iguais de caldo de triptose e incubado a 37 ° C por 12 h. Após este período, 100 µL de inóculo padronizado (10<sup>4</sup> UFC/mL) de *B. abortus* 2308, 544 e 2683 foi inoculado na mistura. As amostras foram cultivadas por 24 h, a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100 µL destas culturas foram plaqueadas em ágar triptose e incubadas a 37 ° C, em 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 h.

*E. coli* ATCC 25922 (controle suscetível) no volume de 100 µL com concentração de 10<sup>4</sup> UFC/mL foi inoculada em caldo BHI adicionado do sobrenadante de BAL e incubado por 24 h. As placas de ágar MacConkey foram inoculadas com 100 µL da mistura anterior e incubadas a 37 ° C, em condições aeróbicas, durante 24 h.

### **5.5. RESULTADOS**

#### **5.5.1 TESTE DO CRESCIMENTO DE *Brucella abortus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

As amostras de *B. abortus* 544, 2308 e 2683 não foram capazes de crescer em ágar MRS ou ágar triptose semi-sólido quando este meio foi vertido em placas contendo ágar MRS. No entanto, todas as amostras de *B. abortus* testadas foram capazes de crescer em meio BHI, BHI contendo 20 g/L de D-glicose (Synth, São Paulo, Brasil), equivalente à concentração de D-glicose do meio MRS e em ágar Mueller-Hinton.

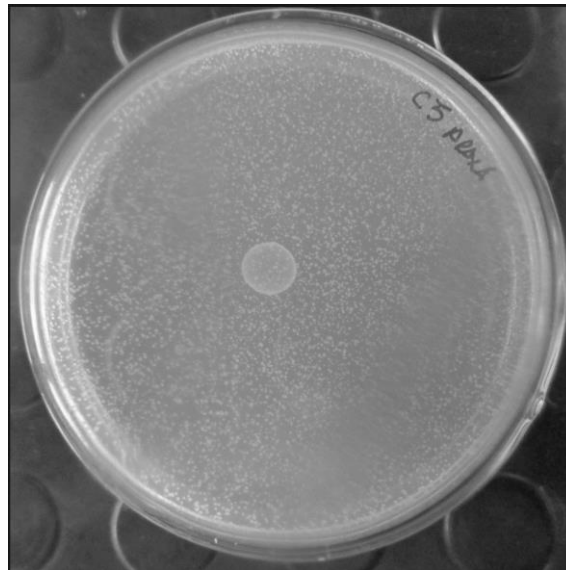
As amostras de *B. abortus* 544, 2308 e 2683 não conseguiram crescer no caldo MRS, porém observamos que todas as proporções de caldo de triptose com caldo MRS permitiram o crescimento de *B. abortus*. Portanto, a proporção 1: 2 foi utilizada para os testes de antagonismo de BAL contra o patógeno.

#### **5.5.2. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS CONTRA *B. abortus***

##### **5.5.2.1 ENSAIO DE ANTAGONISMO SPOT-ON-THE-LAWN**

Nenhuma amostra de BAL foi capaz de inibir *B. abortus* 2308, 544 e 2683 no ensaio de antagonismo *Spot-on-the-lawn* usando meio BHI e BHI com D-glicose para o crescimento de *B. abortus* como indicador (Figura 3.1). A estirpe de *E. coli* ATCC 25922 foi usada como controle suscetível e foi antagonizada por amostras de BAL somente quando se usou o meio MRS, com halos de inibição de 4,2 a 8,5 mm. No entanto, em ensaios realizados utilizando o meio BHI ou BHI com D-glucose, não foi observada inibição de *E. coli* ATCC 25922.

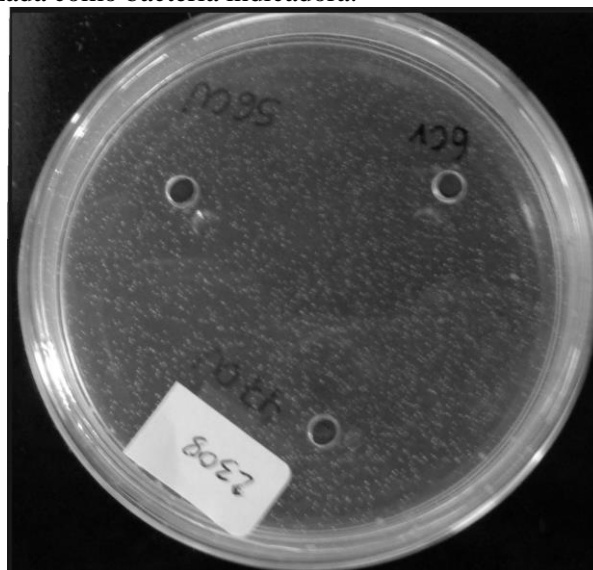
Por observação em ensaios prévios que as amostras de BAL não inibiram *E. coli* no teste “spot-on-the-lawn” em ágar Mueller-Hinton este meio não foi utilizado em ensaios posteriores com *B. abortus*.



**Figura 3. 1.** Ensaio *spot-on-the-lawn* de cultura de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus*

### 5.5.2.2 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os resultados do ensaio de difusão em ágar estão apresentados na Tabela 3. 2. As contagens de BAL em caldo MRS para a produção de sobrenadantes variaram de  $10^7$  a  $10^9$  UFC/mL e exibiram um pH ácido, variando de 3,89 a 5,96. Apesar do baixo pH e alta concentração de BAL no sobrenadante, nenhuma das amostras de *B. abortus* testadas (2308, 544 ou 2683) foram inibidas neste ensaio (Figura 3.2). Além disso, não foram observados halos de inibição quando *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como bactéria indicadora.



**Figura 3. 2.** Ensaio de difusão em ágar dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus*

**Tabela 3. 2.** Concentração (UFC/mL) e pH do sobrenadante de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL), isoladas de queijo Minas artesanal usadas no ensaio de difusão em ágar contra *B. abortus* 544, 2308 e 2683, e *E. coli* ATCC 25922.

Amostras de BAL	Contagem de BAL no sobrenadante (UFC/mL)	pH do sobrenadante <sup>a</sup>
<b>Campos das Vertentes</b>		
1	$5.55 \times 10^8$	$3.89 \pm 0.07$
26	$4.50 \times 10^8$	$3.92 \pm 0.01$
4	$7.25 \times 10^8$	$3.89 \pm 0.03$

47	1.00 x 10 <sup>9</sup>	3.90 ± 0
56	6.40 x 10 <sup>8</sup>	3.97 ± 0
6	6.65 x 10 <sup>8</sup>	3.90 ± 0.09
<b>Araxá</b>		
A1	3.80 x 10 <sup>8</sup>	4.41 ± 0.06
A6	6.35 x 10 <sup>8</sup>	4.43 ± 0.03
B206	2.85 x 10 <sup>8</sup>	4,35 ± 0.00
B16	5.40 x 10 <sup>8</sup>	5.15 ± 1.5
C5	3.40 x 10 <sup>8</sup>	4.10 ± 0.03
E5	4.55 x 10 <sup>8</sup>	5.32 ± 0.39
<b>Serra da Canastra</b>		
B19	9.30 x 10 <sup>8</sup>	4.23 ± 0.29
B4	3.65 x 10 <sup>8</sup>	4.90 ± 0.13
B7	2.30 x 10 <sup>7</sup>	5.96 ± 0.26
B17	7.10 x 10 <sup>8</sup>	3.95 ± 0.03
A8	3.71 x 10 <sup>7</sup>	5.80 ± 0.41
D8	5.40 x 10 <sup>8</sup>	4.52 ± 0.32

<sup>a</sup>Média e Desvio padrão

### 5.5.2.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS SOBRENADANTES DE CULTURA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

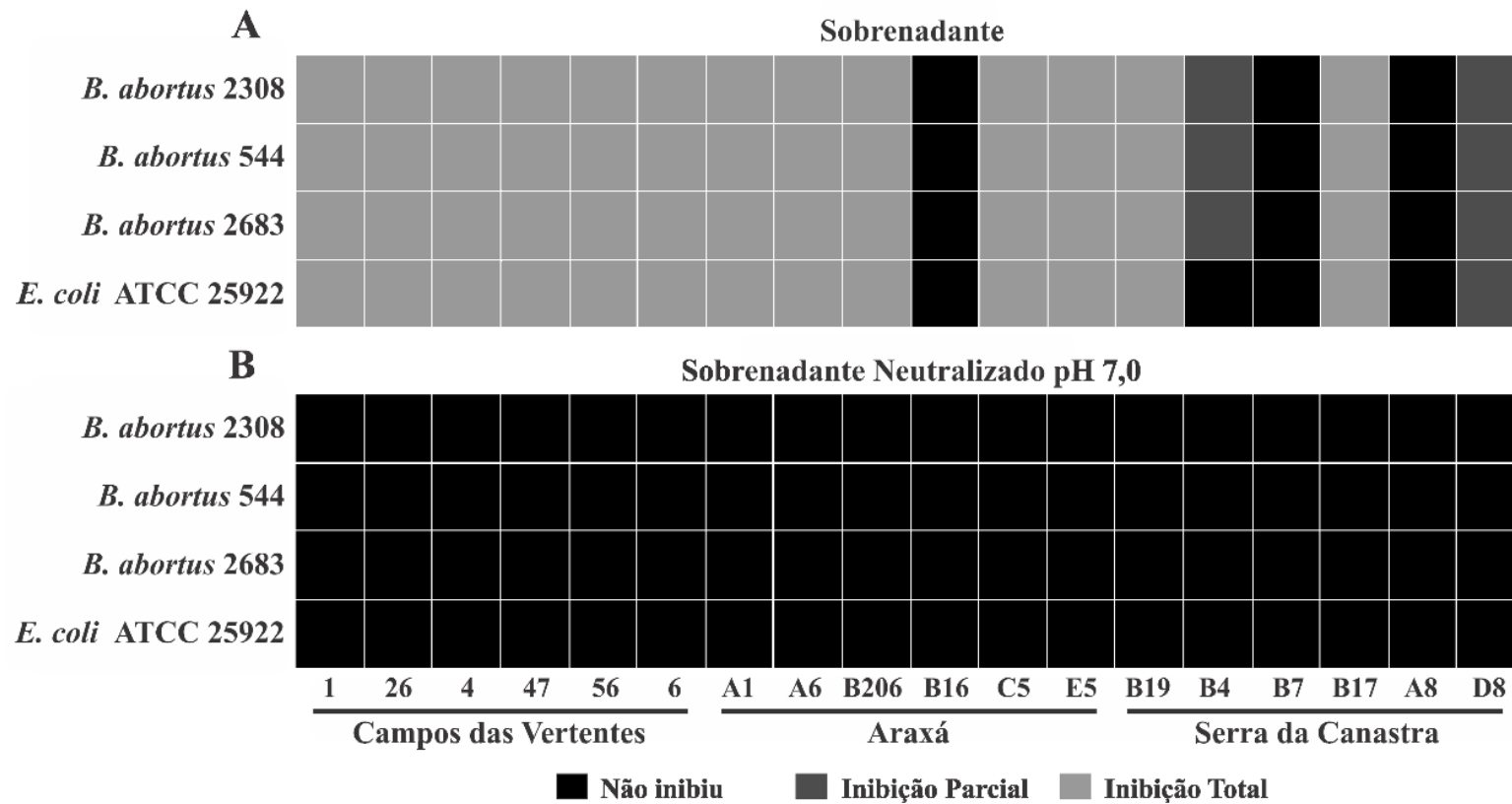
Os resultados da atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas contra *B. abortus* estão mostrados na Tabela 3. 3 e na Figura 3. 3 e Figura 3. 4. Os sobrenadantes produzidos pelas BAL apresentaram pH ácido, de 3,84 a 6,0, dependendo da amostra e concentração de BAL, que variou de 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> UFC / mL. Das 18 amostras testadas, 13 BAL (72,22%), apresentaram crescimento mais rápido e maior concentração no caldo MRS, reduzindo o pH do meio abaixo de 4,65 e foram capazes de inibir totalmente todas as amostras de *B. abortus* testadas. Quando o pH estava entre 4,65 e 5, as BAL conseguiram inibir parcialmente o crescimento de *B. abortus* e no pH acima de 5,6 não foi observada inibição. Em contraste, quando os sobrenadantes de BAL foram neutralizados para o pH 7,0, não inibiram o crescimento das amostras de *B. abortus* ou *E. coli* testadas (Figura 3. 3).

**Tabela 3. 3.** Concentração (UFC/mL) e pH do sobrenadante de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL), isoladas de queijo Minas artesanal usadas no ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas contra *B. abortus* 544, 2308 e 2683, e *E. coli* ATCC 25922.

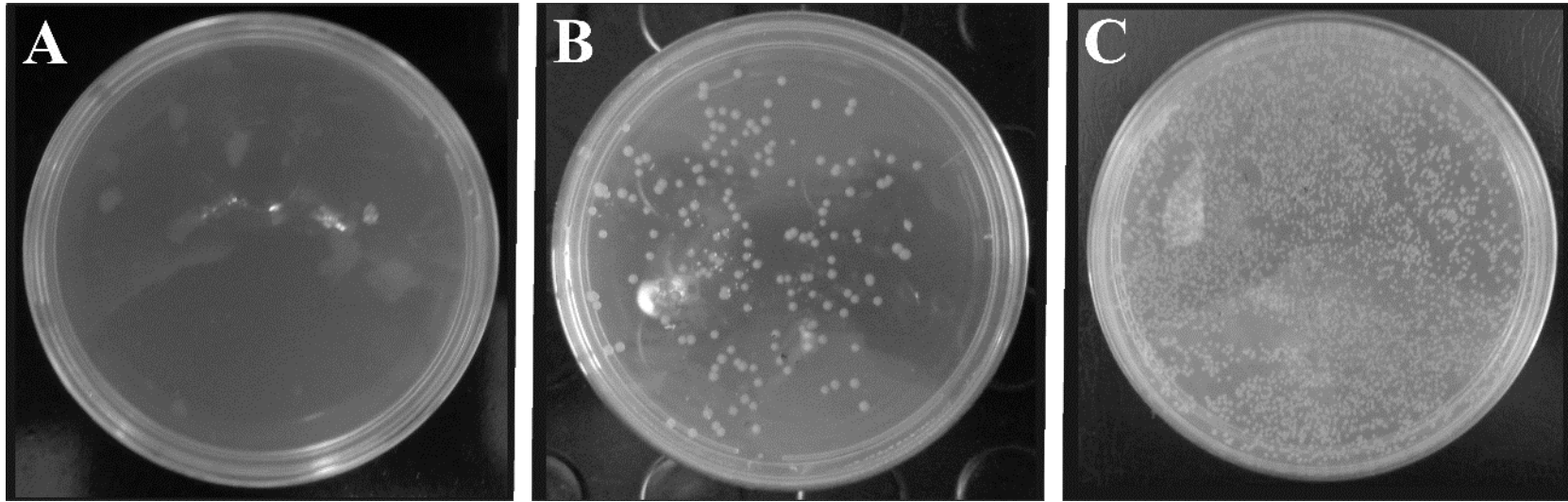
Amostras de BALs	Contagem de BAL no sobrenadante (UFC/mL)	pH do sobrenadante <sup>a</sup>
<b>Campos das Vertentes</b>		
1	1.49 x 10 <sup>9</sup>	3.85 ± 0.07
26	1.88 x 10 <sup>9</sup>	3.86 ± 0.02
4	1.34 x 10 <sup>9</sup>	3.88 ± 0.04
47	2.20 x 10 <sup>9</sup>	3.85 ± 0.03
56	1.73 x 10 <sup>9</sup>	3.93 ± 0.06
6	1.01 x 10 <sup>9</sup>	3.88 ± 0.07
<b>Araxá</b>		
A1	9,35 x 10 <sup>8</sup>	4.21 ± 0.09
A6	1.83 x 10 <sup>9</sup>	4.21 ± 0.03
B206	9.88 x 10 <sup>8</sup>	4.21 ± 0.04
B16	3.45 x 10 <sup>5</sup>	6.10 ± 0.21
C5	1,70 x 10 <sup>9</sup>	4.11 ± 0.03
E5	1.42 x 10 <sup>9</sup>	4.30 ± 0.19

<b>Amostras de BALs</b>	<b>Contagem de BAL no sobrenadante (UFC/mL)</b>	<b>pH do sobrenadante<sup>a</sup></b>
<b>Serra da Canastra</b>		
B19	1.13 x 10 <sup>9</sup>	4.14 ± 0.16
B4	2.73 x 10 <sup>9</sup>	5.00 ± 0.29
B7	2.35 x 10 <sup>8</sup>	5.69 ± 0.13
B17	3.08 x 10 <sup>9</sup>	3.89 ± 0.07
A8	1.21 x 10 <sup>8</sup>	5.87 ± 0.17
D8	2.30 x 10 <sup>9</sup>	4.65 ± 0.21

<sup>a</sup> Média e Desvio padrão



**Figura 3.** 3. Efeito antagonista do sobrenadante e sobrenadante com pH 7,0 neutralizado de culturas de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus* 544, 2308 e 2683, e *E. coli* ATCC 25922



**Figura 3. 4.** Ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal contra *B. abortus*. A, inibição total; B, inibição parcial; C, controle positivo.

## 5.6. DISCUSSÃO

As três diferentes amostras virulentas de *B. abortus* testadas, 2308, 544 e 2683 (POESTER et al., 2006; DORNELES et al., 2014; MIRANDA et al., 2015) foram inibidas pela maioria do sobrenadante produzido por amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal (13 de 18 amostras, 72,22%) (Figura 3. 3). Além disso, duas amostras de sobrenadante de BAL isoladas da Serra da Canastra inibiram parcialmente o crescimento das amostras de *B. abortus* e apenas três das 18 amostras de BAL testadas, uma de Araxá e duas da região da Serra da Canastra, não inibiram o crescimento do *B. abortus*. Juntos, esses resultados mostram o potencial do uso dessas amostras de BAL para aumentar a inocuidade do queijo Minas artesanal.

Várias técnicas podem ser usadas para estudos de antagonismo, mas o meio MRS, seletivo para o cultivo de BAL, é tradicionalmente usado (GRIMOUD et al., 2010; COSTA et al., 2013; TULINI; WINKELSTRÖTER; DE MARTINIS, 2013). No entanto, a incapacidade de *B. abortus* crescer no meio MRS torna impossível a utilização de técnicas de antagonismo que utilizam este meio como base para avaliar a atividade antimicrobiana de BAL contra *B. abortus*.

O uso do meio BHI também não foi promissor no ensaio *spot-on-the-lawn*, já que nenhum halo de inibição pode ser observado em *B. abortus* e nem mesmo em *E. coli* ATCC 25922, que já foi inibida pelas amostras de BAL testadas em estudos prévios utilizando o meio MRS nos ensaios (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA et al., 2017). Esses resultados podem ser devido a menor concentração de D-glicose no meio BHI em comparação com o MRS, uma vez que a fermentação de glicose em ácido-lático, lactato, dióxido de carbono e etanol é importante para o antagonismo exercido pelas BAL contra patógenos (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Complementarmente, o meio BHI foi suplementado com concentração final de 20 g/L de D-glucose, mas mesmo com a adição de D-glucose neste meio, o antagonismo de *B. abortus* ou *E. coli* ATCC 25922 (controle susceptível) não foi observado. Contudo, o meio BHI já foi utilizado para o antagonismo de *Listeria monocytogenes* por BAL (HARRIS; DAESCHEL, 1989) e também usado como meio alternativo para a detecção de amostras de BAL com potencial antimicrobiano, produzindo principalmente substâncias de natureza proteinácea, como bacteriocinas (MORAES et al., 2010) devido a sua baixa concentração de glicose (2%), o que minimiza a produção de ácido. De fato, o meio de cultura tem um papel essencial nos ensaios de antagonismo *in vitro* e deve fornecer um ambiente nutricional ideal para sustentar o crescimento de todos os microrganismos utilizados no teste, como BAL e bactérias indicadoras (HUYS; D'HAENE; SWINGS, 2002).

Os resultados observados no ensaio *spot-on-the-lawn* com *E. coli* ATCC 25922 em MRS, BHI ou ágar BHI suplementado com D-glucose mostram que a atividade antagonista de BAL é influenciada pela composição do meio de cultura e embora BAL cresça em todos os meios, a produção e difusão de substâncias antagonistas não ocorrem da mesma maneira em todos os meios de cultura (DJADOUNI; KIHAL, 2012; ZAMFIR; STEFAN; GROSU-TUDOR, 2016). Da mesma forma que em nossos achados, outros estudos também demonstraram que a atividade antagonista de BAL contra patógenos através da produção de substâncias, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, geralmente ocorre em testes realizados com o meio MRS, não sendo observada da mesma maneira em BHI (MATARAGAS et al., 2004; ZALÁN et al., 2005; MORAES et al., 2010). O meio MRS provavelmente possui nutrientes como aminoácidos, vitaminas do complexo B, bases purinas e pirimidinas entre outros, ausentes no BHI, necessários para a produção de substâncias com efeito antagonista em patógenos (DE KWAADSTENIET et al., 2005; DJADOUNI; KIHAL, 2012).

Os resultados para o ensaio de difusão em ágar demonstraram que, apesar do baixo pH do sobrenadante produzido pelas amostras de BAL testadas (Tabela 3. 2), não houve inibição das amostras de *B. abortus* e *E. coli* ATCC 25922. O ensaio de antagonismo por difusão em ágar pode exibir um grau variável de atividade inibitória contra diferentes patógenos. Estudos anteriores observaram a inibição do mesmo controle (*E. coli* ATCC 25922) usado neste estudo (ASLIM et al., 2005; LEITE et al., 2015) bem como de outros patógenos, incluindo *L. innocua*, *S. aureus* e *E. faecalis* (HERREROS et al., 2005; YANG et

al., 2012), enquanto que para outros microrganismos como *L. monocytogenes* e *E. coli* K 12 (ATCC 10798), nenhuma inibição foi observada (HARRIS; DAESCHEL, 1989; YANG et al., 2012).

A variação do grau de atividade inibitória contra diferentes patógenos pelo ensaio de difusão em ágar provavelmente ocorre devido as amostras de BAL utilizadas, pH ácido, presença e concentração de peróxido de hidrogênio ou bacteriocina no sobrenadante, ou pela difusão de ácidos orgânicos no ágar não ter sido suficiente para ocasionar no antagonismo dos patógenos (BOGOVI; ROGELJ, 1998). Além disso, nesta técnica a quantidade de substância antagonista é limitada e o patógeno pode continuar a crescer devido a condição do meio de cultura propiciar o seu desenvolvimento (HARRIS; DAESCHEL, 1989). Assim, com base em nossos resultados, o ensaio de difusão em ágar também não foi adequado para o estudo de BAL no antagonismo de *Brucella* spp.

De fato, o ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas contra *B. abortus* foi a única técnica que possibilitou o antagonismo de *B. abortus*, provavelmente por fornecer o ambiente nutricional ideal para sustentar o crescimento de todos os microrganismos utilizados no teste (Huys et al., 2002). Este resultado mostrou que as substâncias antagonistas estavam presentes no sobrenadante produzido pelas amostras de BAL testadas. Além disso, quando os sobrenadantes da cultura de BAL foram neutralizados para pH 7,0, o efeito de inibição nas amostras de *B. abortus* testadas foi revertido. Também foi observada uma estreita relação entre o pH final do sobrenadante de BAL e a inibição de *B. abortus*. O sobrenadante de BAL com pH entre 4,6 e 5 inibiu parcialmente o crescimento de amostras de *B. abortus* e um pH inferior a 4,6 foi necessário para a completa inibição do patógeno (Tabela 3. 3). Não encontramos estudos que avaliaram a sobrevivência *in vitro* de *Brucella* spp. em ácido láctico, principal metabolito produzido por BAL, responsável pela redução do pH nos produtos lácteos, no entanto, um ensaio realizado em meio de cultura contendo ácido clorídrico mostrou que o pH 5 permitiu a sobrevivência de *B. melitensis* por período inferior a 3 semanas, enquanto que em pH inferior a 4 a sobrevivência do microrganismo foi menor que 24 horas (EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990), o que corrobora nossos resultados. Em contraste, *B. abortus* pode sobreviver por 8 dias em pH 4, a 5 ° C, em solução tampão citrato / fosfato 0,1 M, inoculadas com 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC / mL de *B. abortus* (DAVIES; CASEY, 1973).

Apesar dos diferentes períodos de sobrevivência relatados na literatura para *Brucella* spp. em meio de cultura com baixo pH, em estudos com avaliação da sobrevivência de *Brucella* spp. no queijo, iogurte e buttermilk, a redução do pH na fermentação foi essencial para reduzir a viabilidade de *Brucella* spp. e a sobrevivência do patógeno foi inversamente proporcional ao pH dos produtos lácteos (EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990; ZÚÑIGA ESTRADA et al., 2005; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Além do pH, os ácidos orgânicos presentes no sobrenadante também se difundem através da membrana bacteriana, com liberação de íons H<sup>+</sup>, causando perturbações nos processos intracelulares, alterações na permeabilidade da membrana, levando a morte bacteriana (IVEY; MASSEL; PHISTER, 2013). Esses resultados sugerem fortemente que os ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo fermentativo de BAL foram as principais substâncias responsáveis pela inibição de *B. abortus*.

As BAL testadas neste estudo são derivados de queijos artesanais e o ácido láctico é produzido em maior proporção durante a produção e maturação destes queijos, mas outros ácidos como ácidos acético, fórmico e propiónico também são produzidos pelo metabolismo de BAL (LEROY; DE VUYST, 2004), sendo que o pH dos queijos Minas artesanais podem variar de 4,6 a 5,5 (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016). Desta forma, os valores de pH dos queijos artesanais se encontram no intervalo de pH observado em nossos resultados que levou à inibição parcial de *B. abortus* (Tabela 3. 3). No entanto, vale a pena enfatizar que, neste estudo, avaliamos o efeito de cada BAL na sobrevivência de *B. abortus* de forma isolada. Em queijos, uma variedade de amostras de BAL poderiam atuar em conjunto, sinergicamente, produzindo, além de ácidos orgânicos, outras substâncias antagonistas, que, juntamente com as mudanças nos fatores intrínsecos e extrínsecos do queijo, podem influenciar na sobrevivência de agentes patogênicos e causar uma inibição total de *Brucella* spp. nos queijos (BERESFORD; WILLIAMS, 2004; GÁLVEZ et al., 2010).



A concentração do inóculo de BAL usado no presente estudo mimetiza a concentração encontrada em queijos Minas artesanais, que varia entre  $10^5$  e  $10^9$  UFC / g (RESENDE et al., 2011; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016). Membros do gênero *Lactobacillus*, especialmente *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. rhamnosus*, são desejáveis nos queijos Minas artesanais, sendo relacionados às características sensoriais únicas e ao potencial probiótico desses produtos (ARCURI et al., 2013; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2016). Além disso, a escolha das amostras de BAL utilizadas no presente estudo foi motivada pela demonstração de sua atividade antagonista contra outros agentes patogênicos em estudos anteriores *in vitro*, como *Salmonella enterica* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* e também seu potencial probiótico (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). Portanto, as BAL que apresentaram efeito inibitório contra *B. abortus* são as mais desejáveis de estar presentes nos queijos Minas artesanais e podem ser utilizados para contribuir com a inocuidade deste alimento.

O inóculo de *B. abortus* usado neste estudo também mimetiza a situação encontrada no campo, pois está no intervalo da quantidade de microrganismo eliminadas no leite de animais infectados, de  $10^1$  a  $10^6$  UFC / mL, embora a maioria dos animais elimine *B. abortus* de forma intermitente em baixas concentrações durante lactação (CARPENTER; BOAK, 1928; DAVIES; CASEY, 1973; CAPPARELLI et al., 2009). Portanto, os resultados de inibição observados nos testes *in vitro* poderiam refletir com mais precisão o que acontece nos queijos Minas artesanais produzidos com leite cru potencialmente contaminado com *B. abortus*.

Apesar de BAL poder contribuir para a inocuidade dos produtos lácteos produzidos com leite cru, por inibição de alguns microrganismos patogênicos, sua presença e uso não excluem a aplicação de medidas como boas práticas de ordenha e boas práticas de fabricação e especialmente, a adoção de vigilância epidemiológica e medidas de controle para reduzir a brucelose animal, visando reduzir o risco de saúde pública.

## 5.7. CONCLUSÕES

Entre os ensaios de antagonismo *in vitro* avaliados neste estudo com BAL contra *B. abortus*, o ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas foi a única técnica que produziu resultados úteis, inibindo total ou parcialmente *B. abortus*.

*B. abortus* foi inibida por sobrenadante de diferentes amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal, indicando que o uso dessas amostras poderiam ser uma maneira alternativa de aumentar a segurança e a conservação dos queijos elaborados com leite cru. Pesquisas futuras devem ser conduzidas para avaliar a viabilidade de *B. abortus* em queijo Minas artesanal inoculado com as amostras de BAL avaliadas.

## 5.8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; ACURCIO, L. B.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014.

ARCURI, E. F.; EL SHEIKHA, A. F.; RYCHLIK, T.; PIRO-MÉTAYER, I.; MONTET, D. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2013.

ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z. N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, v. 38, n. 6, p. 691–694, 2005.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 287–317, 2004.

BOGOVI, B.; ROGELJ, I. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process*

*Biochemistry*, v. 33, n. 3, p. 345–352, 1998.

CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; IANNACCONE, M.; ROPERTO, S.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2041–2047, 2009.

CAPUANO, F.; CAPPARELLI, R.; MANCUSI, A.; ESPOSITO, S.; CORRADO, F.; GUARINO, A. Detection of *Brucella spp.* in stretched curd cheese as assessed by molecular assays. *Journal of Food Safety*, v. 33, n. 2, p. 145–148, 2013.

CARPENTER, C. M.; BOAK, R. *Brucella abortus* in milk and dairy products. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, v. 18, n. 6, p. 743–51, 1928.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 2016.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. Brucellosis in humans and animals. *Geneva: World Health Organization Press*, p. 89 p., 2006.

COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACÚRCIO, L. B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M. F. S.; NUNES, Á. C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 6, p. 1858–1866, 2013.

DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 153, n. 1–2, p. 58–65, 2012.

DAVIES, G.; CASEY, A. The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *British Veterinary Journal*, v. 129, n. 4, p. 345–353, 1973.

DE KWAADSTENIET, M.; TODOROV, S. D.; KNOETZE, H.; DICKS, L. M. T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, n. 3, p. 433–444, 2005.

DE PAULA, C. L.; MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C. M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF, S. D.; MEGID, J. Detecção de *Brucella spp.* em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 82, p. 1–5, 2015.

DJADOUNI, F.; KIHAL, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 3, p. 435–444, 2012.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

DORNELES, E. M.; SANTANA, J.; ALVES, T.; PAULETTI, R.; MOL, J. P. da S.; HEINEMANN, M.; LAGE, A. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16). *BMC Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 186, 2014.

EL-DAHER, N.; NA'WAS, T.; AL-QADERI, S. Effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 523–528, 1990.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION). Expert consultation: Guidelines for the evaluation of probiotics in food, p. 1–11, 2002.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5Supl2, p. 3385, 2016.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 142–148, 2010.

GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTH, F.; MATOPE, G.; MUMA, J.; MARCOTTY, T.; PFEIFFER, D.; SKJERVE, E. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 241–248, 2013.

GRIMOUD, J.; DURAND, H.; COURTIN, C.; MONSAN, P.; OUARNÉ, F.; THEODOROU, V.; ROQUES, C. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, v. 16, n. 5, p. 493–500, 2010.

HAMDY, M. E. R.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *The Veterinary Journal*, v. 163, n. 3, p. 299–305, maio 2002.

HARRIS, L.; DAESCHEL, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v. 52, n. 6, p. 384–387, 1989.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZALEZ, L.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 455–459, 2005.

HUTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against entero and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 6, p. 1324–1332, 2006.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; SWINGS, J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, n. 6, p. 402–406, 2002.

IVEY, M.; MASSEL, M.; PHISTER, T. G. Microbial interactions in food fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 4, p. 141–62, 2013.

KARA, R.; AKKAYA, L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarajisar, Turkey. *British Journal of Dairy Sciences*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2013.

KUZDAS, C. D.; MORSE, S. The survival of *Brucella abortus*, U.S.D.A. strain 2308, under controlled conditions in nature. *Cornell Veterinarian*, v. 44, n. 2, p. 216–228, 1953.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M. F.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic potential of selected Lactic acid bacteria strains isolated

- from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 6, p. 3622–3632, 2015.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.
- LUIZ, L. M. P.; CASTRO, R. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; NUNES, A. C.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n. 1, p. 1–4, 2016.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 219–230, 2015.
- MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; TSAKALIDOU, E.; METAXOPOULOS, J. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus*L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 85, p. 191–198, 2004.
- MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F.; LÓPEZ-MERINO, A.; SUÁREZ-GÜEMES, F. *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 12, p. 1257–61, dez. 2011.
- MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; CENTENO, J. a; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of “Tetilla” raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, v. 18, p. 151–158, 2001.
- MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica de América Central*, v. XIII, n. Número Especial EGAL, p. 1–16, 2011.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, v. 38, n. 6, p. 732–749, 1938.
- MIRANDA, L. L.; DORNELES, E. M. S.; PAULETTI, R. B.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*, v. 33, n. 4, p. 507–511, 2015.
- MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 17–22, 2007.
- MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; TASSINARI ORTOLANI, M. B.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 9, p. 1320–1324, 2010.
- PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006.
- POESTER, F. C.; GONÇALVES, V. S. P.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L.; OLSEN, S. C.; SCHURIG, G. G.; LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v. 24, n. 25, p. 5327–5334, 2006.
- POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; NUNES, A. F. C. A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, 2002.

SALES, G. de A. *Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano*. Dissertação de mestrado pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 106, 2015.

SANT'ANNA, F. M.; ACURCIO, L. B.; ALVIM, L. B.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SILVA, A. M.; NUNES, Á. C.; NICOLI, J. R.; SOUZA, M. R. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, p. 1–10, 2017.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *American Society for Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 722–756, 1976.

TULINI, F. L.; WINKELSTRÖTER, L. K.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. *Anaerobe*, v. 22, p. 57–63, 2013.

WARETH, G.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; NEUBAUER, H.; ROESLER, U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 10, p. 1339–1343, 2014.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 140, n. 2–3, p. 149–157, 2009.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, v. 2, n. 1, p. 48, 2012.

ZALÁN, Z.; NÉMETH, E.; BARÁTH, Á.; HALÁSZ, A. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, v. 43, n. 3, p. 219–225, 2005.

ZAMFIR, M.; STEFAN, I.-R.; GROSU-TUDOR, S.-S. Influence of growth medium composition on the bacteriocin activity of some lactic acid bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 22, n. 6, p. 12126–12135, 2016.

ZÚÑIGA ESTRADA, A.; MOTA DE LA GARZA, L.; SÁNCHEZ MENDOZA, M.; SANTOS LÓPEZ, E. M.; FILARDO KERSTUPP, S.; LÓPEZ MERINO, A. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 47, n. 3–4, p. 88–91, 2005.

## 6. CAPÍTULO 4. EFEITO DA MATURAÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE *Brucella abortus* EM QUEIJOS “TIPO MINAS ARTESANAL ”

### 6.1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos “tipo Minas artesanal” durante o período de maturação, associadas às modificações físico-químicas e na microbiota competidora presente no produto. O experimento foi realizado em três repetições e com três tratamentos (inóculo de  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus* no leite cru, inóculo de  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* no leite cru e controle negativo, sem adição do patógeno). Todos os queijos foram elaborados com leite cru e fermento natural endógeno. Os queijos foram maturados a  $22,5^\circ\text{C}$  em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) com 60 a 70% de umidade e analisados nos dias 1, 8, 15, 22, 29, 48 e 60 dias de maturação para isolamento de *B. abortus*, coliformes a  $30^\circ\text{C}$ , *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., bolores e leveduras, *Salmonella* spp, porcentagens de extrato seco total, gordura, gordura no extrato seco, umidade, proteína total, cloreto e determinação de pH. A diminuição da concentração de *B. abortus* durante o tempo de maturação foi avaliada por análise de sobrevivência. A influência de variáveis microbiológicas e físico-químicas na sobrevivência de *B. abortus* em queijos durante a maturação foi avaliada por regressão de Poisson utilizando “generalized estimating equations” (GEE), após múltipla imputação dos valores ausentes empregando um algoritmo “random forest”. Os resultados demonstraram que nos queijos elaborados com inóculo de  $10^3$  UFC/mL *B. abortus* sobreviveu por até 15 dias de maturação e naqueles elaborados com  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* por período entre 22 e 29 dias. Depois de 15 dias de maturação a ausência de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo, coliformes totais e *Escherichia coli* foi observada em todos os queijos. *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, bactérias ácido-lácticas, bolores e leveduras persistiram nos queijos até 60 dias de maturação. *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma análise. Foi observado aumento no extrato seco, proteína total, gordura e porcentagem de gordura no extrato seco durante os 60 dias de maturação. No entanto, o teor de umidade e o pH dos queijos diminuíram durante o processo e houve pouca variação na concentração de cloretos. A única variável no modelo que mostrou um efeito significativo na redução de *B. abortus* durante a maturação foi o tempo, com uma redução média de cerca de 5% na concentração de *B. abortus* por dia de maturação. Portanto, nossos achados indicam que um período de maturação de 29 dias foi eficiente na redução da viabilidade de *B. abortus* em todos os queijos produzidos, contribuindo para a segurança do queijo artesanal de Minas e consequentemente reduzindo o risco à saúde pública.

**Palavras-chave:** queijo, microbiota do leite, brucelose, maturação, segurança alimentar

### 6.2. ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the survival of *Brucella abortus* in Minas artisanal cheeses during the ripening period, associated to the physicochemical changes and the competing microbiota present in the product. The experiment was carried out using three treatments (two *B. abortus* inocula in milk,  $10^3$  CFU / mL and  $10^6$  CFU / mL, and a negative control) with three replicates for each treatment and time point. All cheeses were made with raw milk and endogenous starter culture, ripened at  $22.5^\circ\text{C}$  in a biochemical oxygen demand incubator (BOD) with 60 to 70% humidity and analyzed at days 1, 8, 15, 22, 29, 48 and 60 of ripening for isolation of *B. abortus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp, molds, and yeasts, and for total dry extract, fat, fat in dry extract, moisture, total protein, chloride and pH determination. A survival analysis was performed to evaluate the decrease of *B. abortus* concentration during ripening time. The influence of microbiological and physico-chemical variables on the survival of *B. abortus* in cheeses during ripening was evaluated by a Poisson regression using generalized estimating equations (GEE), after multiple imputation by chained equations of missing values using random forest algorithm. The results showed that in cheeses inoculated with  $10^3$  CFU / mL *B. abortus* survived for up to 15 days and in those produced with  $10^6$  CFU / mL *B. abortus* survived for 22 to 29 days. After 15 days of ripening, the absence of *Staphylococcus* spp. coagulase-positive, total coliforms and *E. coli* was observed in all cheeses. *Staphylococcus* spp. coagulase-negative, acid-lactic

bacteria, molds and yeasts persisted in cheeses up to 60 days of ripening. *Salmonella* spp. was not detected at any time. It was observed increases in dry extract, total protein, fat and percentage of fat in the dry extract during the 60 days of ripening. However, moisture content and pH of the cheeses decreased during ripening and there was little variation in chloride concentration. The only variable in the model that showed a significant effect on the reduction of *B. abortus* during ripening was time, with a mean decrease of about 5% on the concentration of *B. abortus* per ripening day. Therefore, our findings indicate that a ripeness period of 29 days was efficient in reducing the viability of *B. abortus* in all cheeses produced, contributing for safety of the Minas artisanal cheese and consequently reducing the public health risk.

**Keywords:** cheeses, milk microbiota, brucellosis, food safety, ripeness.

### 6.3. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma das zoonoses mais importantes e difundidas no mundo (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Em bovinos, a doença apresenta sintomatologia ligada principalmente a infecção do sistema reprodutivo de fêmeas e machos, além da glândula mamária, e ocasiona perdas produtivas significativas (LAGE et al., 2008; CARVALHO NETA et al., 2010; SANTOS et al., 2013; ALVES et al., 2015). Em seres humanos, os sintomas são variáveis, como febre intermitente, sudorese, cefaleia, calafrios, artralgias, depressão, perda de peso e mal-estar generalizado (PAPPAS et al., 2006b). A ocorrência da doença na população humana está associada ao consumo de leite cru e derivados lácteos produzidos com leite cru e por contato direto ou indireto com o produto do aborto ou parto de animais infectados (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006). Entre os produtos lácteos, a ingestão de queijos frescos é reportada como principal via de transmissão de *Brucella* spp. ao homem (WHO, 2016).

A incidência da brucelose varia nas diversas regiões do mundo, ocorrendo especialmente em países em desenvolvimento, onde a doença permanece negligenciada, em função de falhas na vigilância epidemiológica, menor preocupação com a qualidade sanitária dos produtos e problemas na adoção de medidas de controle, mas a doença ainda é uma preocupação em países desenvolvidos (DEAN et al., 2012; GODFROID et al., 2013).

No Brasil, a brucelose bovina causada por *B. abortus* é endêmica (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002), com prevalências de propriedades positivas que variaram de 0,91% a 30,6% (FERREIRA NETO et al., 2016). Em Minas Gerais, a prevalência de propriedades positivas para brucelose foi de 3,6% em estudo realizado em 2011 (OLIVEIRA et al., 2016).

A brucelose humana no Brasil é subnotificada, com relatos principalmente como doença ocupacional em trabalhadores de frigoríficos e por acidentes vacinais (LAWINSKY et al., 2010). Os dados relativos a internações no Sistema Único de Saúde (SUS) são as únicas informações disponíveis da ocorrência da brucelose humana no país, com registro de 252 casos de internações e 9 óbitos por brucelose de 2008 a 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Porém, não há relatos da importância da ingestão de leite cru e derivados na ocorrência da brucelose humana no país.

Um animal infectado pode excretar de  $10^1$  a  $10^6$  UFC de *Brucella* sp. por mililitro de leite de forma contínua ou intermitente (DAVIS; CASEY, 1973; CAPPARELLI et al., 2009). Não se sabe ao certo a dose infectante de *Brucella* spp para seres humanos, com estimativa de que entre 10 e 100 células de *Brucella* spp. sejam capazes de ocasionar doença (PAPPAS et al., 2006a), mas casos de brucelose humana têm sido relatados em vários países em decorrência do consumo de leite cru e queijos produzidos com leite não pasteurizado (BROUGH et al., 2011; MORALES-GARCÍA et al., 2015). Além disso, a identificação de *Brucella* spp. tem sido descrita em amostras de leite, queijos produzidos com leite cru e outros produtos lácteos destinados a comercialização em várias regiões do mundo, incluindo no Brasil (MIYASHIRO et al., 2007; KARA; AKKAYA, 2013; WARETH et al., 2014).

Nos queijos produzidos com leite cru, o processo de maturação confere características físico-químicas e sensoriais peculiares e também é tido como forma de assegurar a inocuidade do produto para o consumidor, pois as alterações bioquímicas e microbiológicas decorrentes do processo levariam a eliminação de possíveis patógenos presentes no produto (DONNELLY, 2004). A literatura sobre a

inativação de *B. abortus* durante o processo de maturação do queijo é limitada e varia de acordo com o tipo de queijo produzido. O processo de maturação a 12°C do queijo Camembert produzido com leite inoculado com 10<sup>6</sup> UFC de *B. abortus* levou a ausência do patógeno após 18 dias de maturação (PLOMMET et al., 1988). Em queijo parmesão produzido com 10<sup>8</sup> UFC/mL de *B. abortus*, a viabilidade do microrganismo foi observada por até 25 dias de maturação a 18°C (STARIKOFF et al., 2016). Em queijo Limburguer, o período de maturação de 60 dias a 4,4°C garantiu a ausência de *B. abortus*, enquanto em queijo Cheddar após seis meses de maturação ainda foi possível detectar o microrganismo (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946).

O queijo Minas artesanal é um produto elaborado invariavelmente com leite cru, adicionado de fermento natural endógeno, que juntos ocasionam uma grande variabilidade de microrganismo, dentre eles bactérias ácido-láticas, que propiciam características únicas ao produto (MINAS GERAIS, 2002; MACHADO et al., 2004; RESENDE et al., 2011). Este produto tem grande importância econômica e sociocultural em Minas Gerais e é apreciado por seu sabor peculiar em todo Brasil, sendo seu modo de fazer considerado patrimônio imaterial brasileiro (MINISTÉRIO DA CULTURA, 2000; CHALITA et al., 2009).

No estado de Minas Gerais, período mínimo entre 14 e 22 dias de maturação é regulamentado para comercialização dos queijos das diferentes regiões produtoras (MINAS GERAIS, 2013, 2017), enquanto que para o comércio interestadual e internacional é exigido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), período de 60 dias de maturação para os queijos elaborados com leite cru (BRASIL, 1996). No entanto, não há estudos que avaliem o tempo de maturação necessário para garantir a inocuidade dos queijos artesanais em relação a *B. abortus*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de *B. abortus* em queijos “tipo Minas artesanal” experimentalmente contaminados, durante o período de maturação, associadas às modificações físico-químicas e da microbiota competidora presente no produto.

## **6.4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.4.1. DESENHO EXPERIMENTAL**

O experimento foi realizado em três repetições, com queijos diferentes para cada concentração de inóculo avaliada e uma peça de queijo para cada período de maturação. Desta forma, o experimento apresentou o esquema fatorial 3 x 7, com três grupos experimentais (controle negativo, 10<sup>3</sup> UFC/mL de *B. abortus* e 10<sup>6</sup> UFC/mL de *B. abortus*) e sete períodos de maturação (1, 8, 15, 22, 29, 48, 60 dias).

### **6.4.2. INÓCULOS**

Os inóculos foram preparados com *B. abortus* 2308 crescida em ágar triptose (Difco, Detroit, Michigan, USA) por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após cultivo, a concentração foi ajustada para 10<sup>9</sup> UFC/mL por espectrofotometria (OD<sub>600</sub>) e 14 mL de inóculo a 10<sup>9</sup> UFC/mL e a 10<sup>6</sup> UFC/mL foram preparados e adicionados a 14 L de leite, resultando em amostras de leite com concentrações finais de *B. abortus* de 10<sup>6</sup> UFC/mL e de 10<sup>3</sup> UFC/mL, respectivamente. As concentrações foram confirmadas retrospectivamente pelo “drop counting method” (MILES; MISRA, 1938).

### **6.4.3. PRODUÇÃO DOS QUEIJOS “TIPO MINAS ARTESANAL”**

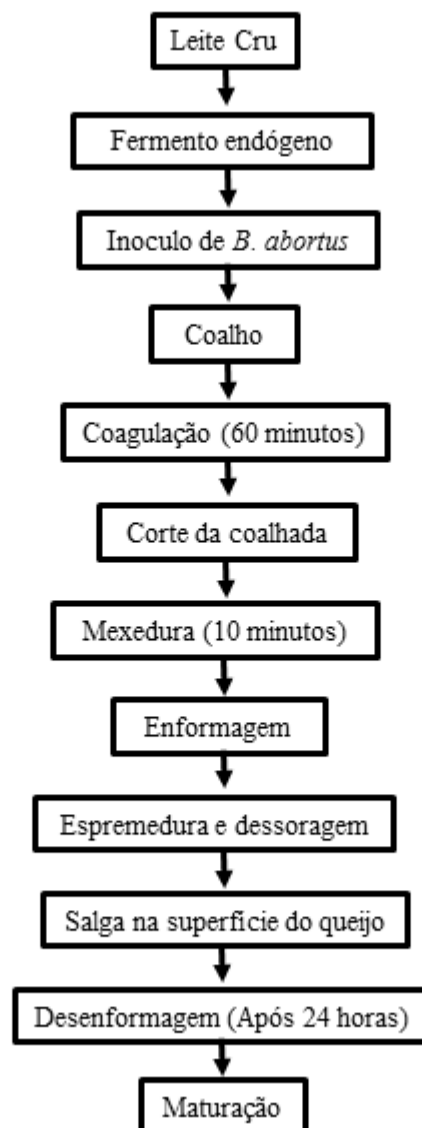
Os queijos foram produzidos com leite cru obtido da fazenda Santa Rita, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que está em processo de certificação como livre para brucelose e com fermento endógeno, obtido de uma propriedade de queijo Minas artesanal da região de Campos das Vertentes, Minas Gerais, Brasil, que realiza exames semestrais para brucelose e não realiza compra de animais. Todas as amostras de leite e fermento endógeno tiveram a ausência de *B. abortus* confirmadas por cultura (ALTON et al., 1988; MINHARRO, 2009).

Os queijos foram elaborados segundo procedimentos descritos por MENESES (2006) (Figura 4. 1), com inóculos de *B. abortus* de 0 UFC /mL (controle), 10<sup>3</sup> UFC / mL e de 10<sup>6</sup> UFC / mL de leite. Os



materiais utilizados para confecção dos queijos foram autoclavados previamente e, para cada tratamento foram utilizadas liras, cubas e formas exclusivas. Para cada repetição, por grupo experimental, foram utilizados 14 litros de leite cru adicionado de 2 % de fermento endógeno, para obtenção de sete queijos de peso médio de 300g.

Posteriormente, o coalho, em diluição recomendada pelo fabricante (Ha-la, Christian Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil), foi adicionado e a massa foi cortada após 60 minutos com lira e realizada mexedura por 10 minutos. Após a dessoragem, a massa foi enformada em formas plásticas de 10 cm, com posterior prensagem manual. A massa, ainda enformada, recebeu a salga nas superfícies, totalizando 3 g de sal e, após 24 horas, foi realizada a desenformagem dos queijos, que foram maturados por 1, 8, 15, 22, 29, 48, 60 dias em câmara incubadora BOD em temperatura a 22,5°C e umidade relativa do ar entre 60 e 70%.



**Figura 4. 1.** Fluxograma de produção do queijo “tipo Minas artesanal”

#### **6.4.4. DETECÇÃO DE *B. abortus* NO LEITE, FERMENTO ENDÓGENO, SORO E QUEIJOS CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE**

O leite, fermento endógeno, soro e queijos experimentais foram avaliados nos períodos de maturação determinados (1, 8, 15, 22, 29, 48, e 60 dias) para a detecção de *B. abortus*.

O leite contaminado com *B. abortus* para produção dos queijos e o soro oriundo da produção dos queijos foram diluídos em base 10 e analisados para confirmação do inóculo de *B. abortus* utilizando o plaqueamento pelo “drop counting method” (MILES; MISRA, 1938) em duplicata, em ágar triptose (Difco, Detroit, Michigan, EUA) suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (*Brucella* Selective Supplement, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (FARRELL, 1974) e Fluconazol (Fagron Iberica, Barcelona, Catalunha, Espanha) (4mg/L). O fermento endógeno foi avaliado pelas mesmas metodologias utilizadas para o leite e soro para confirmar a ausência de *B. abortus*.

Os queijos foram cortados por secção cruzada em pequenos fragmentos e 25g de queijo foram colocados em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de caldo triptose (Difco) e macerados com auxílio de “stomacher” (Modelo MC 1204, ITR, São Paulo, São Paulo, Brasil), por 5 minutos.

Para obtenção de alta sensibilidade analítica no isolamento de *B. abortus* três metodologias foram realizadas, duas quantitativas e uma qualitativa. Na primeira metodologia para quantificação de *B. abortus*, uma alíquota de 100 µL foi utilizada para diluição em base 10 de 10<sup>0</sup> até 10<sup>-5</sup> em caldo triptose (Difco) para o leite, fermento endógeno e soro. Para o queijo as diluições de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup> foram utilizadas e então, de cada diluição foi realizada a contagem pelo “drop counting method” (MILES; MISRA, 1938) em ágar triptose (Difco) suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (FARRELL, 1974) e fluconazol (4mg/L), em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por até 14 dias. Na segunda metodologia para quantificação de *B. abortus*, duas placas de ágar triptose suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (FARRELL, 1974) e fluconazol (4mg/L) foram inoculadas com 500 µL do queijo macerado em caldo triptose, num total de 1,0 mL de inóculo. O limite de detecção desta técnica foi de 10 UFC/g. A concentração final de *B. abortus* nas matrizes foi determinada pelos resultados conjuntos das duas metodologias quantitativas analisadas, ou seja, quando não houve crescimento de colônias na primeira metodologia (“drop counting method”) o número total de colônias observadas na segunda técnica (plaqueamento direto) foi utilizado.

Na metodologia qualitativa, visando melhorar a sensibilidade analítica do cultivo, 1 mL do macerado de queijo foi inoculado em 9 mL de caldo triptose suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (FARRELL, 1974) e fluconazol (4mg/L). Após sete dias de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, 500 µL deste material foram inoculados em duas placas de ágar triptose (Difco), suplementado com a mistura de antimicrobianos de Farrell (FARRELL, 1974) e fluconazol (4mg/L), totalizando 1,0 mL de inóculo.

As colônias com morfologia típica de *Brucella* spp. foram confirmadas por PCR AMOS (BRICKER; HALLING, 1995).

Após duas análises microbiológicas consecutivas com resultado negativo para *B. abortus* os queijos foram considerados negativos.

#### **6.4.5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO LEITE, FERMENTO ENDÓGENO E QUEIJOS CONTROLES**

Os queijos controle negativo foram utilizados para a realização das análises microbiológicas para outros microrganismos em função da infraestrutura laboratorial necessária e para maior biossegurança dos manipuladores.

Os queijos (amostra de 25g) foram macerados com salina peptonada tamponada 0,1% (225mL) com auxílio de “stomacher”, por aproximadamente 5 minutos e, da mesma forma que o leite e fermento endógeno, foram diluídos em base 10 para as análises microbiológicas. A determinação da concentração

de coliformes e *Escherichia coli* foi realizada pelo método Petrifilm (3M Petrifilm™ EC method – 3M Company, St. Paul, Minnesota, EUA) (GINN; PACKARD; FOX, 1986). As concentrações de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e coagulase-negativo, bolores e leveduras e presença de *Salmonella* spp, foram determinadas de acordo com o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001). A determinação da concentração de bactérias ácido-láticas foi realizada em ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco) de acordo com RESENDE et al., (2011).

#### 6.4.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE E QUEIJOS CONTROLES

As amostras de leite foram avaliadas para determinação da porcentagem de gordura, proteínas, lactose e sólidos totais utilizando o Bentley CombiSystem 2300® (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, Estados Unidos ) com base na absorção de comprimentos de onda na região do infravermelho (IDF, 2000). No mesmo equipamento, também foi determinada a contagem de células somáticas por citometria de fluxo (IDF, 1995). A contagem bacteriana total foi realizada por citometria de fluxo (SUHREN; WALTE, 2000) em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos).

Apenas as amostras de queijos controle negativos foram utilizados para a realização das análises físico-químicas pela infraestrutura laboratorial necessária, que não seria possível no laboratório de nível 3 de biossegurança.

Os queijos controle negativo foram avaliados quanto às porcentagens de extrato seco total (EST) e umidade pelo método gravimétrico (IDF, 1982). O teor de gordura foi determinado pelo método do butirômetro de Gerber-Van Gulik (IDF, 2008). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Kjeldahl, por multiplicação da porcentagem de nitrogênio total pelo fator específico de 6,38 (IDF, 1993). As concentrações de cloreto (IDF, 1988) e determinações de pH (BRITISH STANDARDS., 1976) (MERCK, 1993) foram realizadas por técnicas de rotina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 6.4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados do experimento foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2016® (MICROSOFT CORPORATION, 2016) e exportados para realização de todas as análise estatística no software R, versão 3.5.0, 2018 (R CORE TEAM, 2018).

Para avaliar se havia diferença na concentração do inóculo bacteriano presente no leite, soro e queijo das três repetições foi realizada ANOVA seguida do teste de t de Student para comparação entre as matrizes estudadas, considerando erro alfa de 0,05 (SAMPAIO, 2010).

Para avaliação do período de sobrevivência de *B. abortus* nos queijos inoculados experimentalmente foram realizadas análises de sobrevivência utilizado os pacotes “survival”, “icenReg” e “interval” (FAY; PAMELA, 2010; THERNEAU, 2015; ANDERSON-BERGMAN, 2017, DOHOO; MARTIN; STRYHN, 2003).

Para se evitar alta colinearidade no modelo de regressão, as variáveis foram submetidas a análise de correlação de Pearson e, dentre aquelas com correlação igual ou superior a 0,6, somente a mais importante do ponto de vista biológico para a sobrevivência de *B. abortus* no queijo foi mantida no modelo (KLEINBAUM; KLEIN, 2010; GARSON, 2013; WRIGHT, 2017).

Como as variáveis físico-químicas e microbiológicas dos queijos foram estimadas apenas nos queijos controles, em função das restrições de biossegurança nível 3 impostas para o trabalho com *B. abortus*, os valores ausentes foram imputados empregando-se a técnica de múltipla imputação por equações em cadeia com o algoritmo “random forest”, total de 70 imputações e 50 iterações por imputação (WHITE; ROYSTON; WOOD, 2010), utilizando-se os pacotes mice (VAN BUUREN; GROOTHUIS-OUDSHOORN, 2011) e CALIBERrfimpute (SHAH et al., 2014).

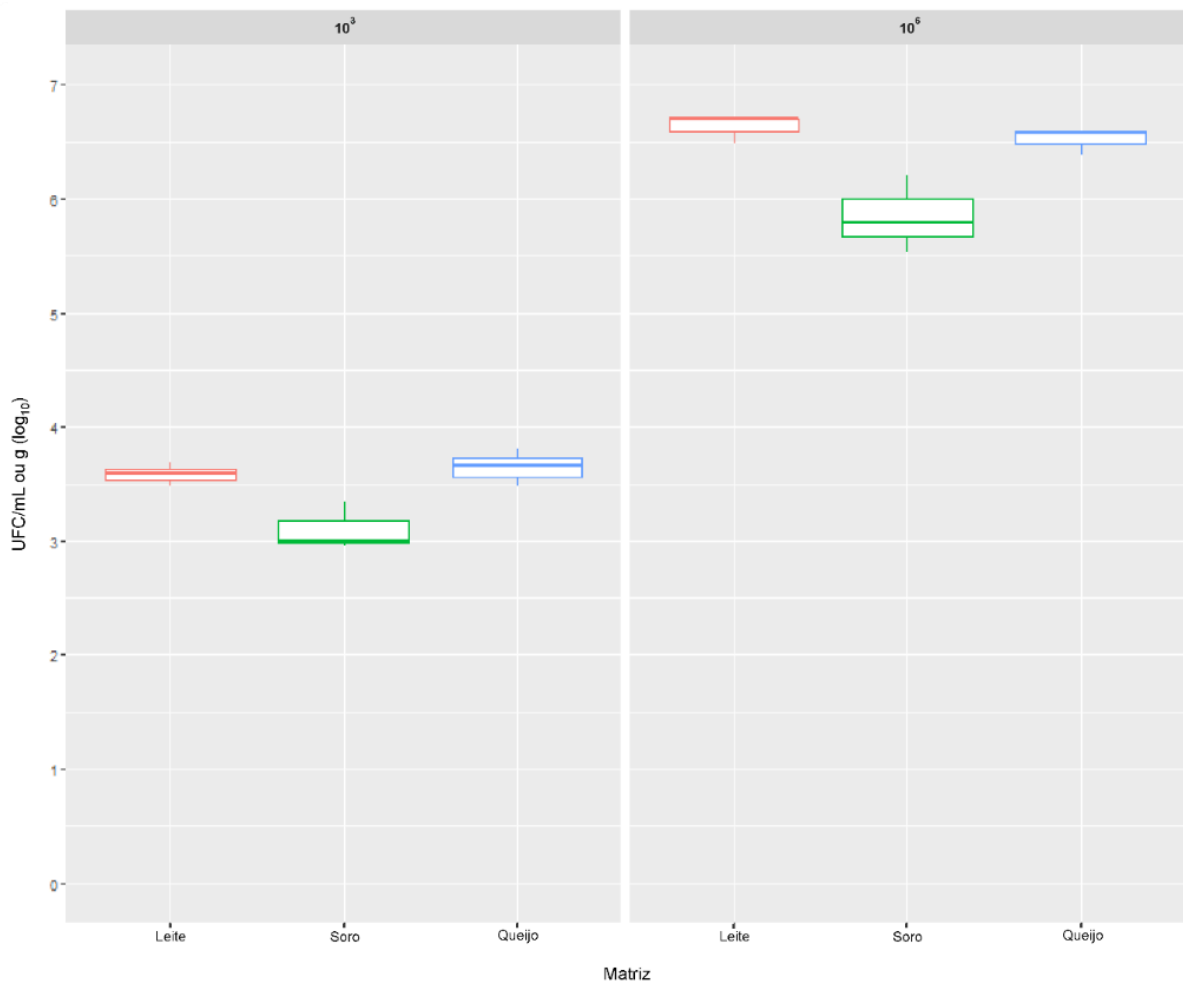
Para o estudo da influência das variáveis microbiológicas e físico-químicas na sobrevivência de *B. abortus* nos queijos foi empregada, após a imputação, a regressão de Poisson utilizando-se o método “Generalized Estimating Equations” (GEE), com estrutura de correlação autoregressiva (AR1) e erro-padrão “sandwich” (HALEKOH; HØJSGAARD; YAN, 2006; KLEINBAUM; KLEIN, 2010; GARSON, 2013). A seleção das variáveis (“purposeful selection”) para o modelo foi realizada inicialmente pela aplicação do modelo de forma univariada para todas as variáveis mantidas após a análise de correlação. Neste etapa, as variáveis que apresentaram valores de P inferiores ou iguais a 0,25 no teste de t foram selecionadas para a etapa seguinte. Na segunda etapa, foi calculado o MI-QIC (SHEN; CHEN, 2013) dos modelos incluindo todas as combinações das variáveis selecionadas na primeira etapa. O modelo com menor MI-QIC (SHEN; CHEN, 2013) foi selecionado. Na etapa seguinte, os valores de P do teste de t das variáveis do modelo foram avaliadas e aquelas com valores menores ou iguais a 0,05 permanecem no modelo.

## 6.5. RESULTADOS

### 6.5.1. DETECÇÃO DE *B. abortus* NO LEITE, SORO E QUEIJOS CONTAMINADOS EXPERIMENTALMENTE

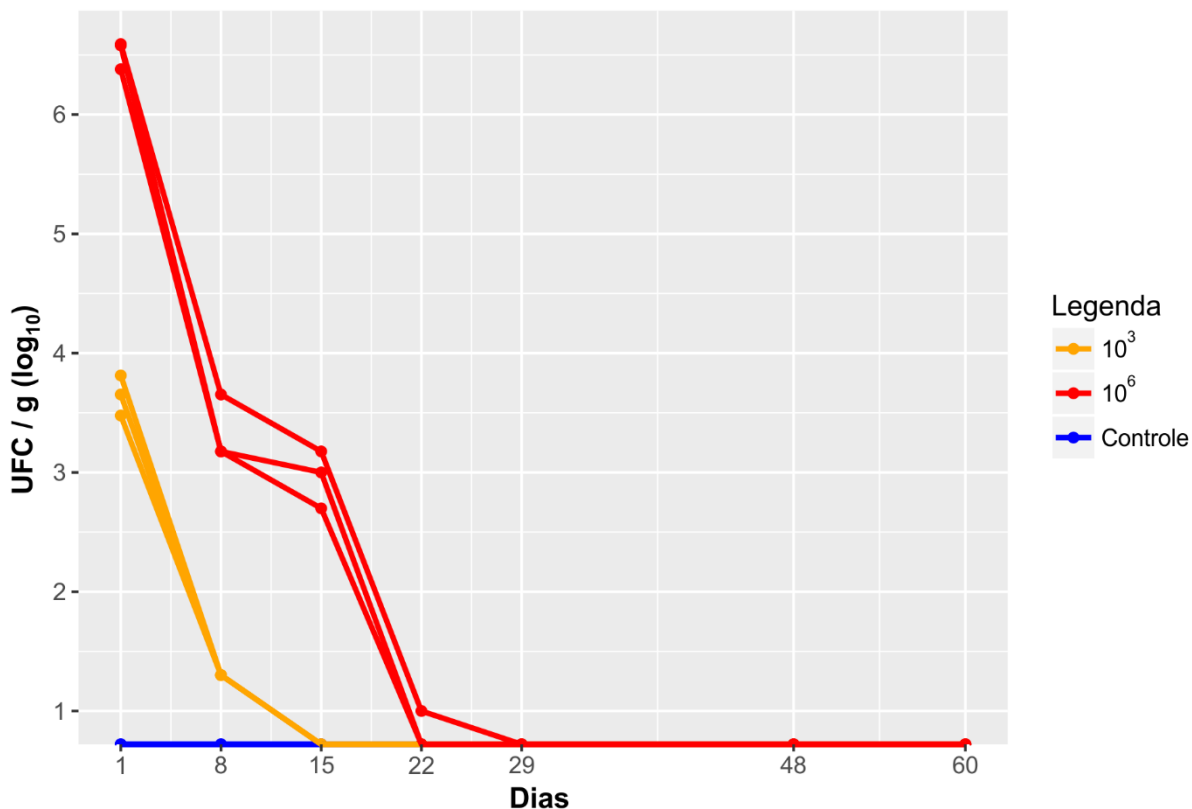
As contagens de *B. abortus* no leite utilizado para a elaboração dos queijos do tratamento  $10^3$  UFC/mL foram confirmadas por cultivo com mediana de  $3,9 \times 10^3$  UFC/mL. No soro oriundo da produção dos queijos a mediana de contagem neste tratamento foi de  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL e no queijo a mediana foi de  $4,5 \times 10^3$  UFC/mL. Já para o tratamento com  $10^6$  UFC/mL, o leite apresentou mediana de  $5 \times 10^6$  UFC/mL *B. abortus*, enquanto no soro a mediana foi de  $6,3 \times 10^5$  UFC/mL e no queijo a mediana foi de  $3,8 \times 10^6$  UFC/mL.

As concentrações de *B. abortus* inoculadas no leite e presentes no soro e queijo com um dia de maturação para os tratamentos  $10^3$  UFC/ mL de *B. abortus* e  $10^6$  UFC/ mL de *B. abortus* são apresentadas na Figura 4. 2. Para o tratamento com  $10^3$  UFC/ mL de *B. abortus*, o soro apresentou concentração menor do microrganismo que o leite ( $p = 0,0403$ ). Já o queijo, apresentou concentração de *B. abortus* semelhante ao leite inoculado ( $p = 0,6057$ ) e maior concentração do patógeno que o soro oriundo de sua produção ( $p = 0,0267$ ). Para o tratamento com inóculo de  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus*, a concentração do patógeno no soro foi menor que no leite inoculado ( $p = 0,3382$ ), mas não houve diferença significativa entre as concentrações de *B. abortus* no leite e queijo ( $p = 0,3382$ ) e entre o soro e queijo ( $p = 0,0621$ ).



**Figura 4. 2.** Resultados da concentração de *B. abortus* no leite, soro e queijos “tipo Minas artesanal” no primeiro dia de maturação para os tratamentos  $10^3$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* no leite

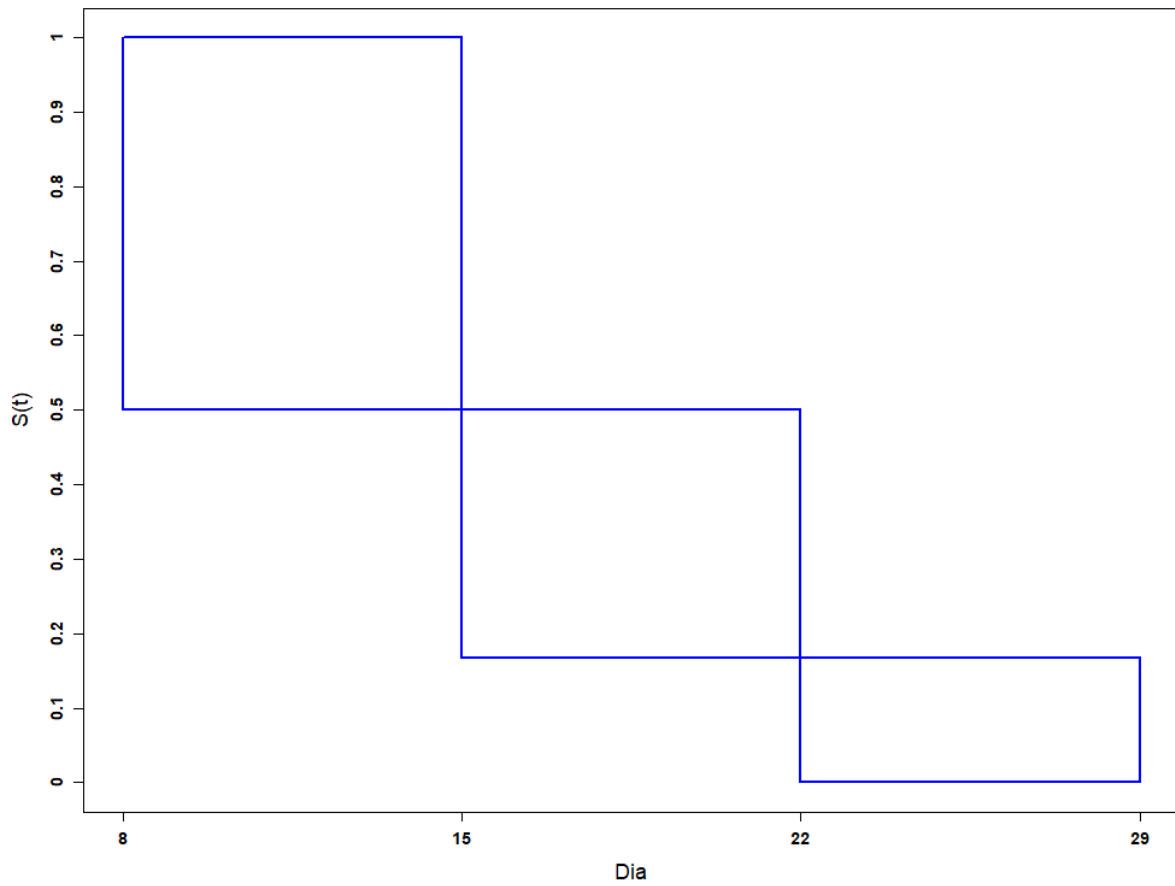
Nas três repetições do experimento com queijos do tratamento  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus* observou-se que após 15 dias de maturação não foi mais possível detectar o patógeno que, se presente, estava abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas (10 UFC/g). Para o grupo experimental de queijos inoculados com  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* a ausência do patógeno foi constatada após 22 dias de maturação na primeira e segunda repetições experimentais e 29 dias na terceira repetição, sendo que nesta repetição apenas 10 UFC/ g foi detectada no dia 22 de maturação (Figura 4. 3).



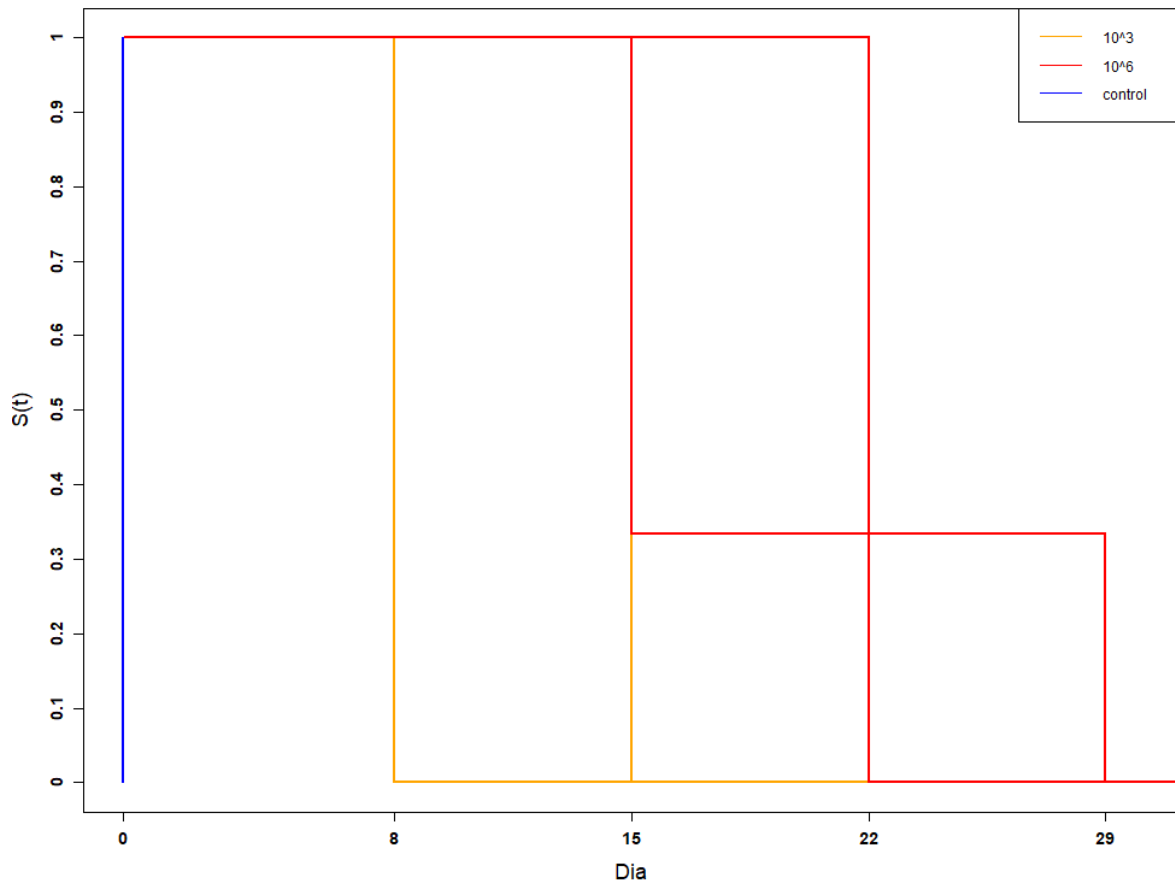
**Figura 4. 3.** Resultados das contagens log UFC/g de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” em três repetições dos tratamentos controle,  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*,  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* nos 60 dias de maturação.

Na análise de sobrevivência, considerando os resultados do tratamento  $10^3$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* em conjunto (Figura 4. 4), podemos observar redução de 50% do inóculo inicial do patógeno nos primeiros 15 dias de maturação, redução de cerca de mais 33% (total de 88%) entre 15 e 20 dias e, redução dos 17% restantes (total 100%) entre 20 e 29 dias de maturação, com a ausência de *B. abortus* nos queijos após 29 dias em todos os queijos.

Na análise de sobrevivência para os três tratamentos separadamente (Figura 4. 5), podemos observar a ausência do patógeno nos queijos controle e ausência de *B. abortus* entre 8 e 15 dias para os queijos do tratamento  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*. Para o tratamento  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus*, entre 15 e 22 dias de maturação foi possível observar uma redução de 67% do inóculo inicial de *B. abortus* nos queijos, sendo que a ausência do patógeno somente foi constatada entre 22 e 29 dias de maturação.



**Figura 4. 4.** Resultados da análise de sobrevivência com percentual de redução de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” considerando os tratamentos  $10^3$  UFC/mL e  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* ao longo da maturação.



**Figura 4. 5.** Resultados da análise de sobrevivência com percentual de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” nos tratamentos controle,  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*,  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus* ao longo da maturação.



## 6.5.2. ANÁLISES DA QUALIDADE DO LEITE CRU E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO FERMENTO ENDÓGENO E QUEIJOS CONTROLES

A ausência de *B. abortus* foi constatada em todas as amostras de leite cru, fermento endógeno e queijos controle pelas metodologias quantitativas e qualitativas de alta sensibilidade utilizadas.

Em relação às análises do leite cru utilizado na produção dos queijos, os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas são apresentados na Tabela 4. 1. Foi observada alta contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e alta contagem de células somáticas (CCS) no leite (Tabela 4. 1), uma vez que a legislação estadual de Minas Gerais preconiza contagem  $\leq 100$  UFC/mL para *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e  $\leq 400.000$  células somáticas/mL (MINAS GERAIS, 2002).

**Tabela 4. 1.** Parâmetros microbiológicos e físico-químicos observados para o leite cru utilizado na fabricação dos queijos “tipo Minas artesanal”.

Parâmetro	Leite cru					
	Média	Mediana	CV <sup>1</sup>	Desvio padrão	IQR <sup>2</sup>	Parâmetro da Legislação <sup>3</sup>
<b>Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)</b>	$6,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^4$	1,73	$1,15 \times 10^9$	$9,99 \times 10^8$	-
<b>Bolores e Leveduras (UFC/mL)</b>	$6,05 \times 10^2$	$1,60 \times 10^2$	1,42	$8,62 \times 10^2$	$7,72 \times 10^2$	-
<b>Coliformes (UFC/mL)</b>	5,33		1,73		$1,85 \times 10^1$	
<i>E. coli</i> (UFC/mL)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	$\leq 100$
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/mL)	$6,66 \times 10^7$	$2,70 \times 10^3$	1,73	$1,15 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$\leq 100$
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (UFC/mL)	$2,16 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	0,99	$2,15 \times 10^3$	$2,15 \times 10^3$	-
<i>Salmonella</i> spp. em 25mL	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>CCS (cél.s.x1000/mL)</b>	473	457	0,29	138	137	$\leq 4 \times 10^5$
<b>CBT (UFCx1000/mL)</b>	32	29	0,58	18,68	18,5	$\leq 1 \times 10^5$
<b>Gordura (g/100g)</b>	3,76	3,75	0,04	0,16	0,16	$> 3$
<b>Proteína (g/100g)</b>	3,30	3,32	0,04	0,14	0,14	$> 2,9$
<b>Lactose (g/100g)</b>	4,42	4,41	0,00	0,03	0,02	$> 4,3$
<b>EST (g/100g)</b>	12,47	12,52	0,02	0,31	0,31	$> 11,5$
<b>ESD (g/100g)</b>	8,71	8,77	0,01	0,16	0,15	$> 8,5$

<sup>1</sup>CV = coeficientes de variação; <sup>2</sup>IQR = intervalo interquartil; <sup>3</sup>(MINAS GERAIS, 2002).

Apesar da ausência de parâmetros legais para o fermento endógeno, tomando como base o mesmo padrão do leite cru (Tabela 4. 1), perceberam-se baixas contagens de microrganismos não desejáveis, exceto pela presença de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (Tabela 4. 2).

**Tabela 4. 2.** Parâmetros microbiológicos avaliados para o fermento endógeno

Parâmetro	Fermento endógeno				
	Média	Mediana	CV <sup>1</sup>	Desvio padrão	IQR <sup>2</sup>
<b>Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)</b>	2,03 x 10 <sup>9</sup>	9,70 x 10 <sup>7</sup>	1,69	3,43 x 10 <sup>9</sup>	2,99
<b>Bolores e leveduras (UFC/mL)</b>	2,97 x 10 <sup>6</sup>	1,11 x 10 <sup>6</sup>	1,42	4,21 x 10 <sup>6</sup>	3,89
<b>Coliformes (UFC/mL)</b>	3,33	0	1,73	5,77	5,00
<b><i>E. coli</i> (UFC/mL)</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b><i>Staphylococcus</i>. coagulase positivo (UFC/mL)</b>	3,33 x 10 <sup>3</sup>	0	1,73	5,77	5 x 10 <sup>3</sup>
<b><i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (UFC/mL)</b>	2,86 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	1,61	4,62 x 10 <sup>5</sup>	4,1 x 10 <sup>5</sup>
<b><i>Salmonella</i> spp. em 25mL</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

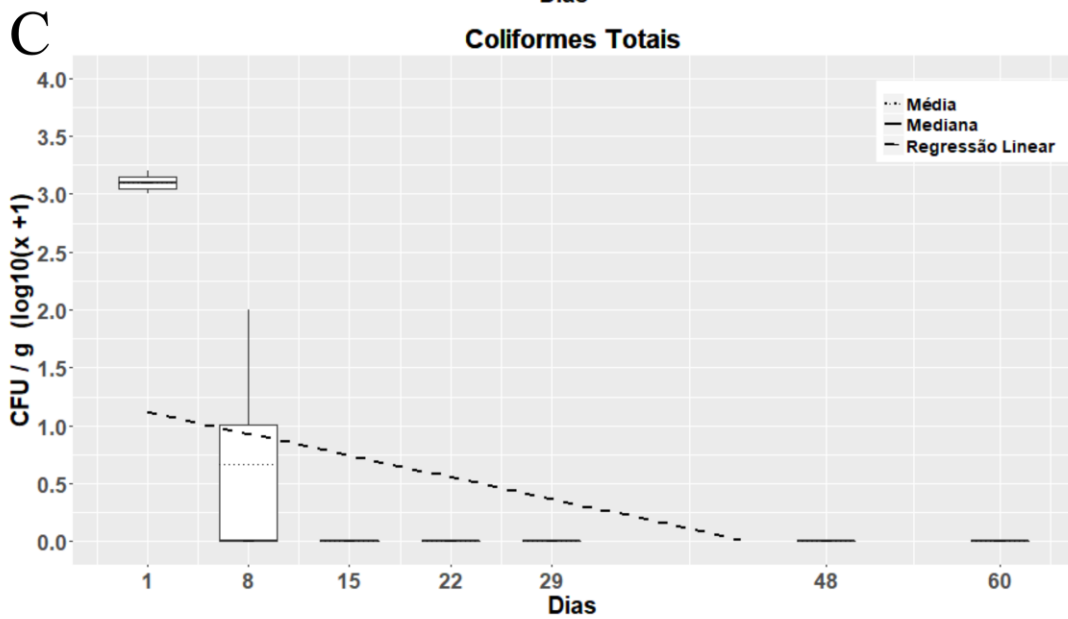
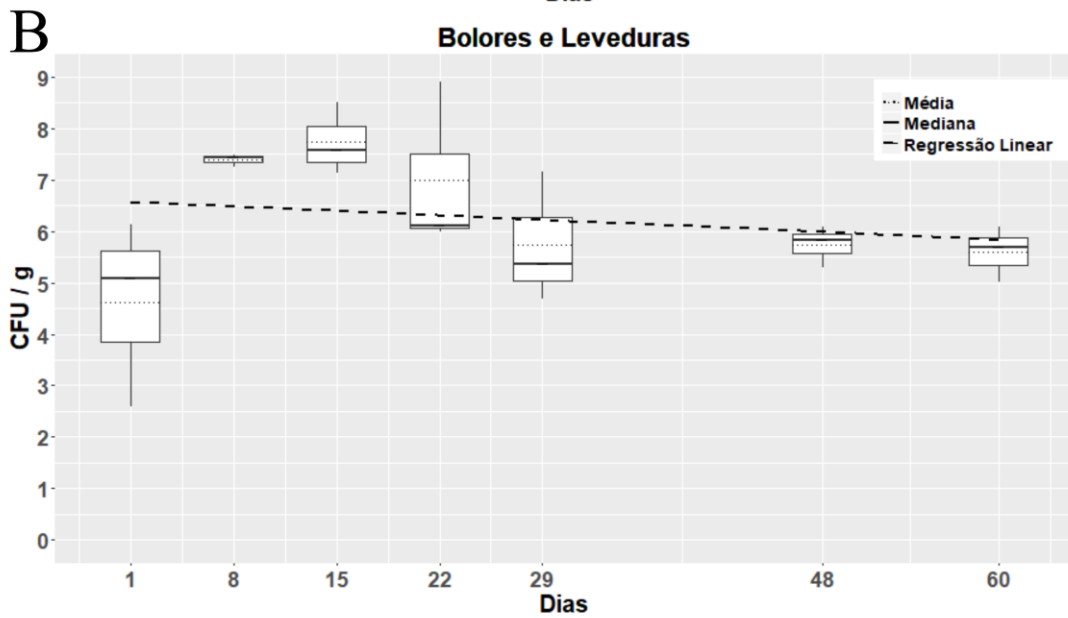
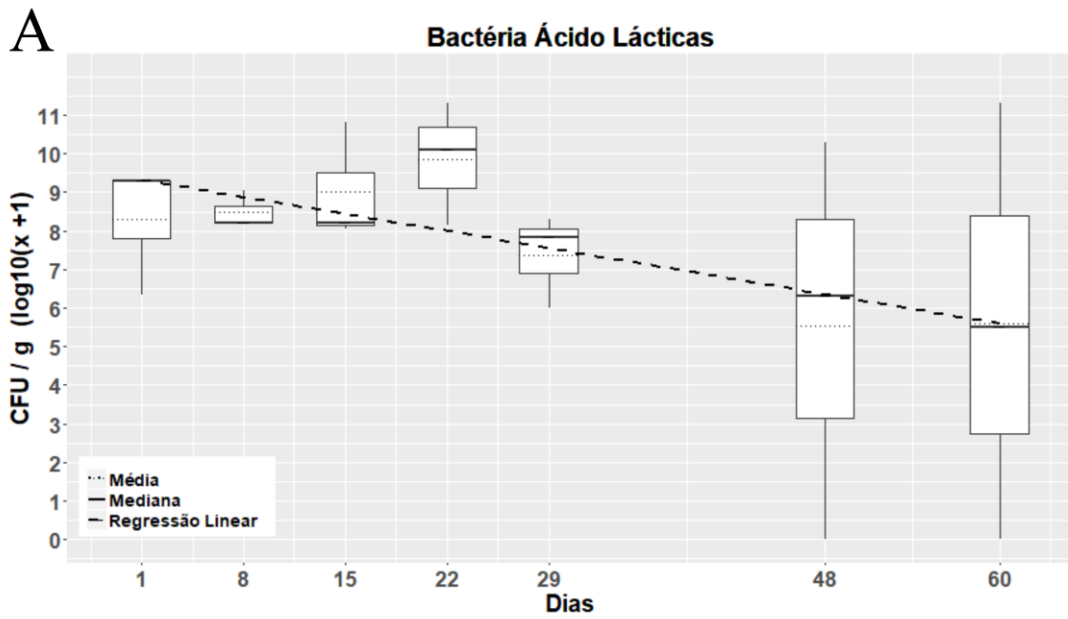
<sup>1</sup>CV = coeficientes de variação; <sup>2</sup>IQR = intervalo interquartil

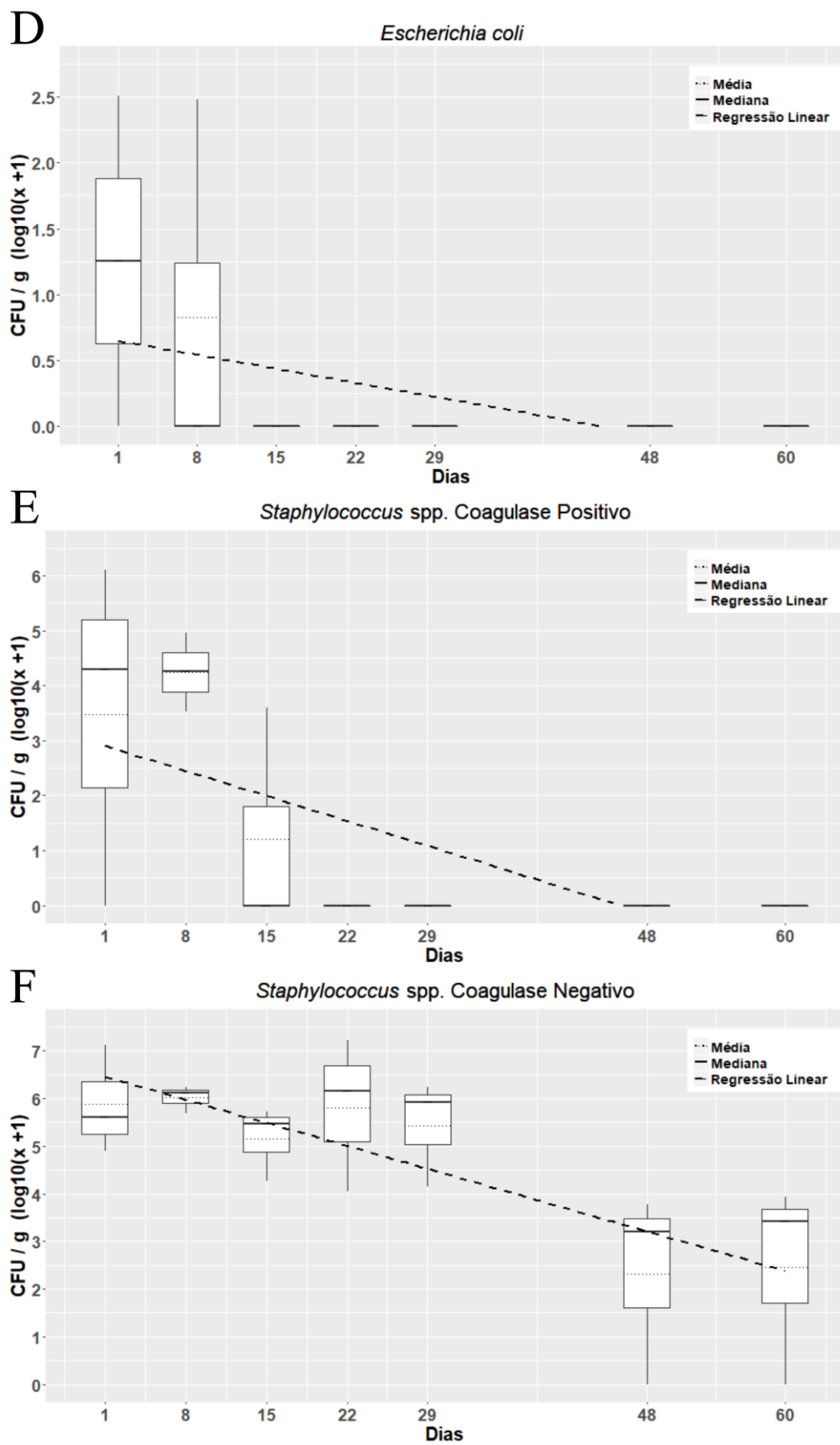
Nos queijos, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo persistiu até os 60 dias de maturação. Em contrapartida, *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo não foi mais detectado após 15 dias de maturação (Figura 4. 6 E e F).

Os coliformes totais estavam em baixas contagens no leite (Tabela 4. 1) e fermento endógeno (Tabela 4. 2), enquanto *E. coli* estava ausente nestas matrizes. No entanto, coliformes totais foram detectados no queijo do primeiro dia de maturação e após 15 dias não foram mais detectados (Figura 4. 6 C). *E. coli* foi detectada no queijo no dia 1 de maturação, mas após 15 dias também não foi mais detectada (Figura 4. 6 D).

Foram observadas contagens elevadas de bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras no leite (Tabela 4. 1), fermento endógeno (Tabela 4. 2) e no queijo até 60 dias de maturação (Figura 4. 6 A e B).

A presença de *Salmonella* spp. não foi constatada no leite, fermento endógeno e queijo em todos os períodos analisados.

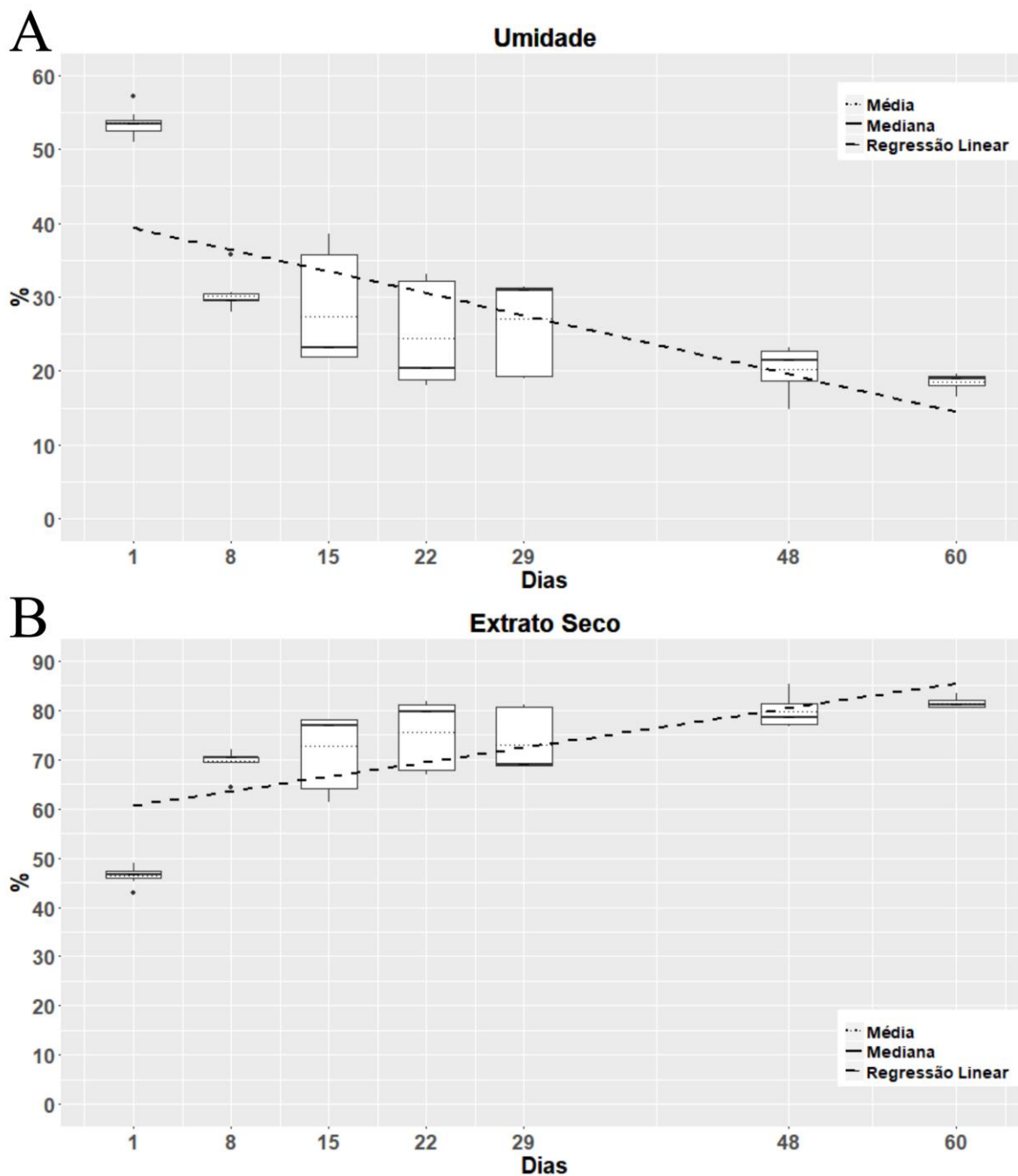


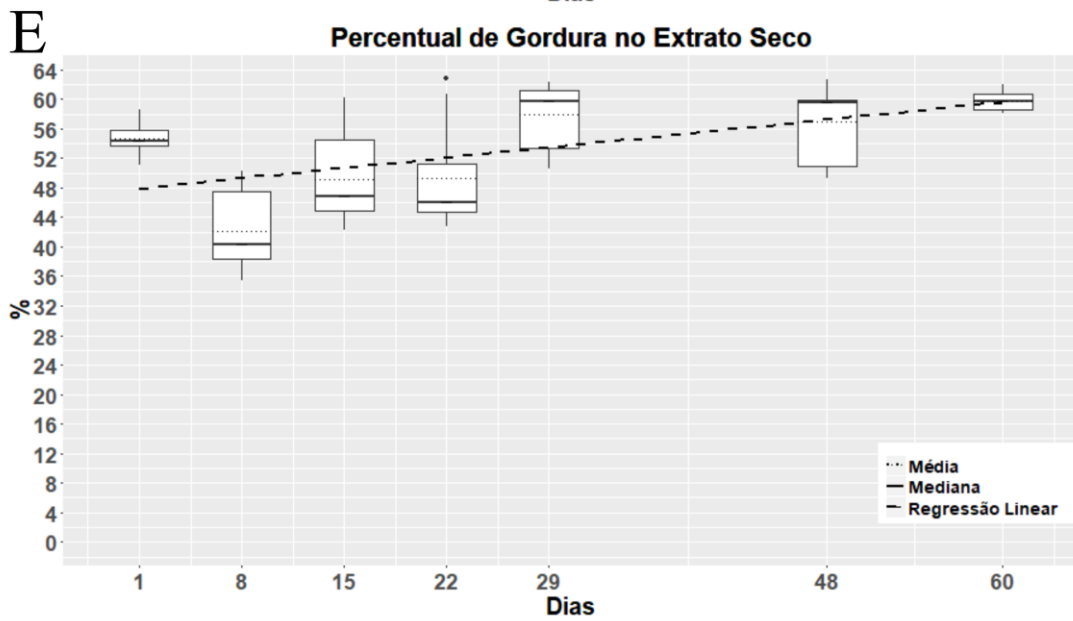
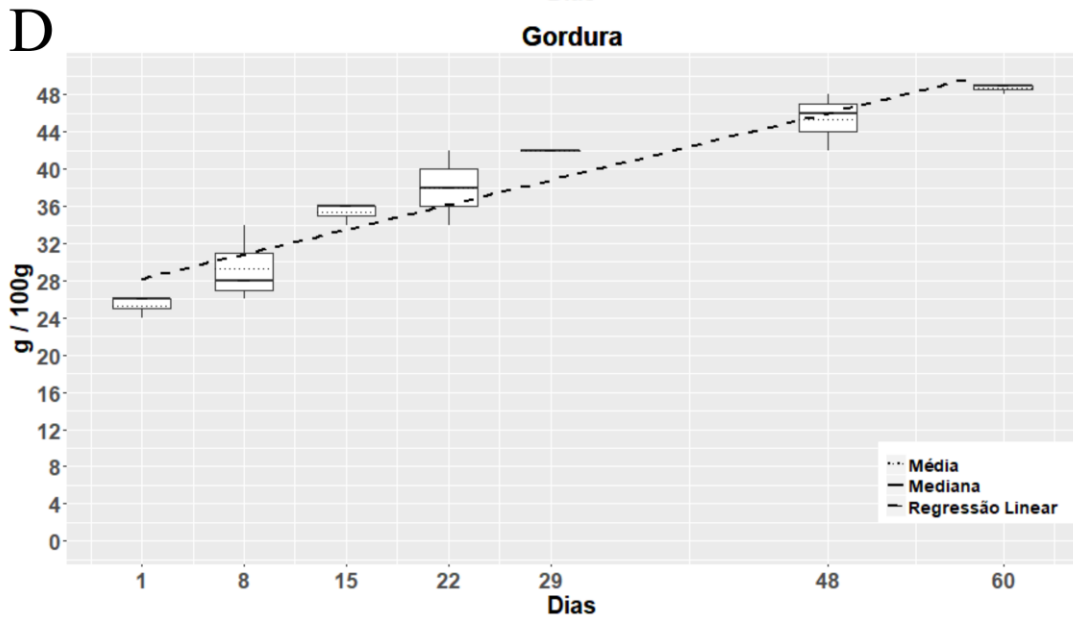
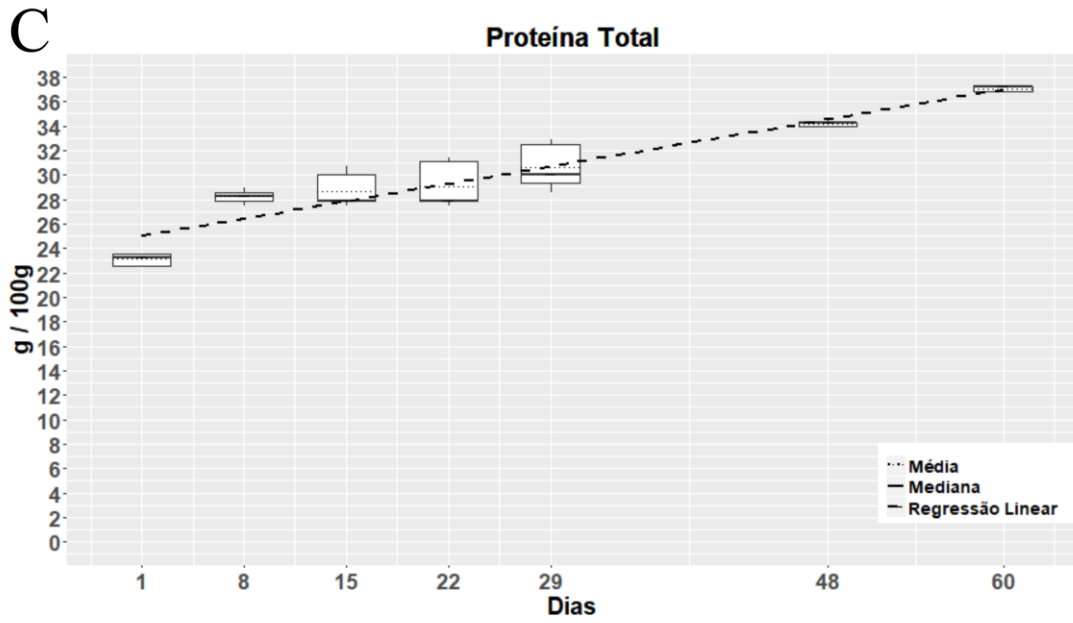


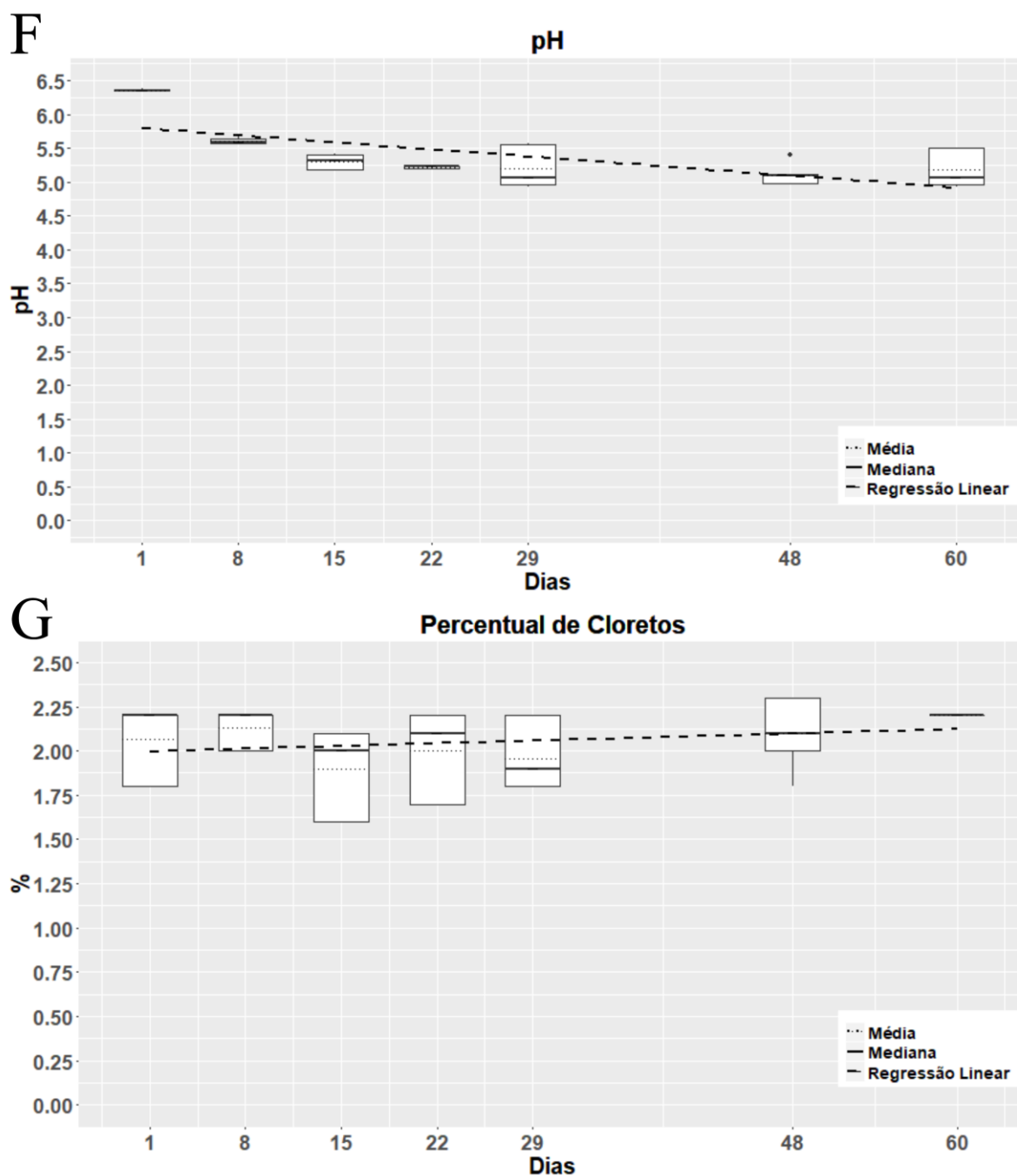
**Figura 4. 6.** Parâmetros microbiológicos avaliados nos queijos “tipo Minas artesanal” do tratamento controle ao longo da maturação. A: Bactérias ácido láticas; B: Bolores e Leveduras; C: Coliformes Totais; D= *Escherichia coli*; E= *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo; F= *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo.

### 6.5.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS CONTROLES

Nas análises físico-químicas dos queijos controle foi observado aumento dos teores percentuais de extrato seco, proteína total, gordura e percentagem de gordura no extrato seco ao longo dos 60 dias de maturação (Figura 4. 7). O teor de umidade e o pH dos queijos reduziram com a maturação, enquanto o teor de cloreto sofreu pouca variação (Figura 4. 7).







**Figura 4. 7.** Parâmetros físico-químicos avaliados nos queijos “tipo Minas artesanal” do tratamento controle ao longo da maturação. A: Percentual de umidade; B= Extrato seco; C=Percentual de proteína total; D= Percentual de gordura; E= Percentual de gordura no extrato seco; F= pH; G= Percentual de cloreto

#### 6.5.4. CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS AVALIADAS NOS QUEIJOS

O ponto de corte de 0.60 de correlação entre as variáveis foi utilizado e dentre as variáveis com correlações iguais ou acima do ponto de corte, uma delas, mais representativa, foi selecionada para o modelo.

A análise de Pearson mostrou correlações superiores a 0,6 entre as variáveis *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo, *E. coli* e coliformes, sendo a variável coliformes selecionada a permanecer no modelo. Também com correlação alta, entre bolores e leveduras e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, a variável *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo foi selecionada. Entre as variáveis proteína

solúvel, extrato seco total e gordura, com correlações acima do ponto de corte, a variável proteína solúvel foi selecionada. As variáveis percentagem de cloreto, percentagem de gordura no extrato seco e bactérias ácido-láticas permaneceram nas análises. Embora altas correlações tivessem observadas entre *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e coliformes totais, entre proteína e umidade, entre proteína e gordura, entre proteína e pH, entre umidade e pH e entre gordura e umidade estas variáveis foram preservadas para a análise univariada em função de sua possível importância teórica para o modelo.

Na análise univariada empregando o modelo de regressão de Poisson por GEE, as variáveis dia, gordura, umidade e pH apresentaram valores de P ao teste de t inferiores a 0,25 e foram selecionadas.

A análise dos diversos modelos nas etapas seguintes de seleção das variáveis mostrou que somente intercepto e a variável dia foram significativos, em alguns modelos. Como as variáveis pH e umidade poderiam ter um significado lógico na diminuição de *B. abortus* nos queijos e há correlação acima de 60% entre elas e, na análise univariada, o valor de P no teste de t foi inferior a 0,20 para a variável pH, foram criadas novas variáveis a partir da interação destas duas variáveis. Entretanto, essas novas variáveis também não se mostraram significativas no modelo.

Apenas a variável dia de maturação foi selecionada por apresentar associação significativa com a sobrevivência de *B. abortus* nos queijos (Contagem de *B. abortus* (UFC/g) = (-0.9449611 x dia de maturação) + 14,8768708).

**Tabela 4. 3)**, resultando no seguinte modelo:

Contagem de *B. abortus* (UFC/g) = (-0.9449611 x dia de maturação) + 14,8768708.

**Tabela 4. 3.** Coeficientes do modelo de regressão final utilizando-se o método “Generalized Estimating Equations” (GEE) para distribuição de Poisson, com estrutura de correlação autoregressiva (AR1)

Variável	Coefficiente estimado	Erro padrão	Valor de t	Valor de P
Intercepto (constante)	14.8768708	0.55766788	26.67694	0.000000
Dia	-0.9449611	0.09365273	-10.09005	1.820766 <sup>-14</sup>

A análise do modelo mostra que a cada dia de maturação é esperado uma redução de 5,654 % na concentração de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal”, mantidas constantes as outras variáveis. O valor do *intercepto* indica que no dia um de maturação a concentração média de *B. abortus* nos queijos era de 2,89 10<sup>6</sup> UFC.

## 6.6. DISCUSSÃO

O período de maturação entre 15 e 29 dias foi suficiente para garantir a ausência de *B. abortus* 2308 inoculada nas concentrações de 10<sup>3</sup> UFC/mL e 10<sup>6</sup> UFC/mL de leite, respectivamente, para produção de queijos “tipo Minas artesanal”, demonstrando a importância da maturação para a segurança alimentar do queijo Minas artesanal.

A concentração de *B. abortus* no queijo tipo Minas artesanal produzido, semelhante ao observado em queijo parmesão fresco (STARIKOFF et al., 2016), foi similar à do leite contaminado, demonstrando que o queijo produzido retém os microrganismos e o potencial para infecção humana.

Apesar de o patógeno ter sido encontrado em menor concentração no soro do que no leite contaminado, semelhante a outras observações para *Brucella* spp na literatura (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015), a concentração de *B. abortus* encontrada ainda é considerada



muito alta (Figura 4. 2). A elevada concentração de *B. abortus* no soro pode levar a preocupações pelo risco de infecção dos manipuladores dos queijos no momento da produção (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Além disso, o fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal é resultante da dessoragem do queijo e utilizado para produção de queijos do dia seguinte. Desta forma, caso *B. abortus* estivesse presente e sobrevivesse nas concentrações elevadas de NaCl do fermento endógeno, poderia ocasionar contaminação dos queijos de produções subsequentes, uma vez que no soro armazenado a temperatura ambiente o microrganismo pode sobreviver por até quatro dias (DAVIES; CASEY, 1973). Outro fato a ser considerado é que usualmente o fermento endógeno é trocado entre os produtores, o que poderia ocasionar contaminação dos queijos de diferentes propriedades por *B. abortus*. O soro resultante dos queijos também é usado na alimentação animal, o que contribuiria com a disseminação da brucelose para outras espécies como bovinos, suínos e cães (BROOKS; BEAL; NIVEN, 2001).

O modelo de regressão de Poisson por GEE utilizado mostrou que a redução de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” pode ser explicada pelo tempo de maturação, pois apenas a variável dia de maturação foi significativa no modelo, o que reforça a importância do processo de maturação para a inocuidade do alimento. Nenhuma das outras variáveis analisadas neste experimento (pH, proteína total, umidade, gordura, cloreto, extrato seco total, percentagem de gordura no extrato seco, concentração de bactérias ácido-lácteas, contagem de coliformes a 30°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., bolores e leveduras, e presença de *Salmonella* spp) mostrou-se associada a redução de *B. abortus* dos queijos durante a maturação. A ausência de significância observada para essas variáveis na elucidação do processo de redução de *B. abortus* nos queijos “tipo Minas artesanal” pode estar ligada ao número total de queijos analisados (63) não ter sido suficiente para a identificação de pequenos efeitos dessas variáveis no processo.

A ausência de isolamento de *B. abortus* nos queijos produzidos com leite inoculado no presente experimento, após a maturação, foi confirmada pela utilização de três metodologias de cultivo em pelo menos duas análises consecutivas. A utilização conjunta de diferentes técnicas quantitativas com altas sensibilidades analíticas permitiu a obtenção de diagnóstico com limite de detecção de 10 bactérias por grama de queijo. Para aumentar ainda mais a sensibilidade analítica, também foi utilizado o enriquecimento (MINHARRO, 2009), que é recomendado para as análises microbiológicas de alimentos, onde se espera a presença de microrganismos estressados, em baixas concentrações e com reduzida taxa de crescimento *in vitro* (CURTIS; LEE, 1995; JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008). Trabalhos anteriores com leite e amostras clínicas de bovinos mostraram que o emprego do enriquecimento pode aumentar em até 50% a taxa de recuperação de *B. abortus* (BRODIE; SINTON, 1975; MINHARRO, 2009; MIRANDA et al., 2016) e em queijo Minas frescal houve aumento em 9,61% de amostras positivas (ALCOLÉA, 2011). Entretanto, no presente estudo, houve 100% de concordância entre as metodologias quantitativas e qualitativas (enriquecimento) utilizadas.

As concentrações de *B. abortus* definidas para contaminação do leite neste estudo foram determinadas considerando-se a eliminação do agente no leite de animais infectados observada na literatura, que variou de  $10^1$  a  $10^6$  UFC/mL (CARPENTER; BOAK, 1928; DAVIES; CASEY, 1973). É sabido que a maioria dos animais infectados elimina o microrganismo no leite em baixas concentrações e de forma intermitente durante a lactação (CAPPARELLI et al., 2009). Em leite naturalmente contaminado em laticínio produtor de queijo Cheddar, cerca de  $10^2$  UFC/mL de *B. abortus* foi detectada (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946) e em sorvete produzido por pequenos produtores e comercializado na Turquia, *B. abortus* foi isolada em concentrações entre  $10^2$  e  $10^3$  Número mais provável /g (KUPLULU; SARIMEHMETOGLU, 2004). Desta forma, o menor inóculo,  $10^3$  UFC/mL *B. abortus* no leite, utilizado no experimento seria o mais provável de ocorrer em condições reais. Além disso, apesar dos autores desconhecerem trabalhos de prevalência de brucelose, especificamente em propriedades produtoras de queijo, sabe-se que a produção de queijo Minas artesanal no estado de Minas Gerais é realizada principalmente em pequenas propriedades (EMATER, 2004) e estudo de prevalência para brucelose no Estado determinou que rebanhos com até 29 número de fêmeas possuem menor chance de ter animais infectados por *B. abortus* (OLIVEIRA et al., 2016). Outro fato a ser observado, é que o leite de animais infectados seria diluído com o leite do restante rebanho antes da produção do

queijo, o que nos leva a acreditar que a concentração de *B. abortus* em queijos Minas artesanais tende a ser baixa.

Foi observado que o período de viabilidade de *B. abortus* no queijo ao longo da maturação sofreu influência da contaminação inicial do leite, sendo que para a maior concentração inoculada, de  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus*, período de maturação mais extenso foi necessário para inativar o patógeno (Figura 4. 3 e Figura 4. 5). O período de maturação mínimo entre 14 e 22 dias é regulamentado pela legislação estadual para comercialização dos queijos das diferentes regiões produtoras de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2013, 2017). Este período seria o suficiente para ausência de *B. abortus* para os queijos experimentais de menor inóculo,  $10^3$  UFC/mL de *B. abortus*, garantindo a qualidade sanitária do produto, mas não seria adequado para a ausência do patógeno nos queijos inoculados com  $10^6$  UFC/mL de *B. abortus*. Apesar de todos os fatores mencionados anteriormente, indicarem que a menor concentração de *B. abortus* seria a mais provável de ocorrer, ressaltamos que para garantir a segurança dos consumidores o pior cenário possível deve ser considerado e o período de maturação mínimo superior a 29 dias fornece maior segurança em relação à inocuidade dos queijos Minas artesanais, no que se refere a sobrevivência de *B. abortus*. No entanto, o controle de brucelose nos rebanhos deve ser considerado como a medida de prevenção mais eficiente para evitar que queijos elaborados com leite cru possam veicular o patógeno para o homem. Portanto, a maturação por período superior a 29 dias não deveria ser considerada como única ou principal medida para a mitigação da presença de *Brucella* spp. em queijos Minas artesanais.

Vale lembrar que apesar de o nosso estudo ter sido conduzido com a amostra de *B. abortus* 2308, reconhecidamente virulenta em desafios em bovinos e camundongos (POESTER et al., 2006; MIRANDA et al., 2015), os resultados devem ser interpretados com cautela. Amostras de *B. abortus* isoladas de bovinos e do homem apresentaram viabilidade diferente quando inoculadas em creme de leite e manteiga (CARPENTER; BOAK, 1928). Assim, maturação do queijo Minas artesanal por período inferior a 29 dias, por exemplo 15 dias, pode impor limitações na garantia de ausência do microrganismo em relação às diferentes amostras selvagens de *B. abortus* circulantes nas regiões produtoras, que podem apresentar sobrevivência variável nos queijos. Além disso, foram observados períodos de maturação superiores aos encontrados em nosso estudo para inativação de *Brucella* spp. em outras variedades de queijo como Cheddar, Limburger e queijo de leite de cabra (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011) e períodos semelhantes, de 18 e 25 dias de maturação, para eliminação de *B. abortus* em queijo Camembert e Parmesão, respectivamente (PLOMMET et al., 1988; STARIKOFF et al., 2016). Desta forma, a composição, modo de produção e condições de maturação diferentes podem interferir na sobrevivência de *B. abortus* nos queijos. Isto também pode estar ocorrendo em queijos Minas artesanais produzidos nas diferentes regiões, pois já se observou que bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais de algumas regiões produtoras podem inibir o crescimento de *B. abortus* enquanto bactérias ácido-láticas de outras regiões não tem efeito sobre *B. abortus* (Capítulo 3 desta tese).

A concentração de *Brucella* spp. para infectar por via oral seres humanos não está completamente definida, mas estima-se que entre 10 e 100 células de *Brucella* spp. sejam capazes de ocasionar a doença por via aerógena (PAPPAS et al., 2006b) e entre 16 e 500 UFC de *B. melitensis* levou a infecção por via intragástrica em camundongos (VERGER, 1991). Além disso, foi demonstrado experimentalmente que a ingestão de doses repetidas de leite cru contaminado com *B. abortus* ocasionou infecção em primatas e seres humanos (FLEISCHNER et al., 1921; MORALES OTERO, 1948). Desta forma, o hábito de ingestão de queijos frescos eleva os riscos de ocorrência de brucelose em seres humanos e, este produto tem sido causa de surtos de brucelose em diferentes regiões do mundo (FARINA et al., 2008; BROUGH et al., 2011; MORALES-GARCÍA et al., 2015). A ingestão de pequena quantidade de queijo contaminada com *B. abortus* é suficiente para causar infecção e pode ocasionar problemas de saúde pública, principalmente o queijo fresco, no qual a viabilidade de *B. abortus* é maior (Figura 4. 3, Figura 4. 4 e Figura 4. 5).

A ausência de *B. abortus* no leite, fermento endógeno e queijos controles eram esperadas, uma vez que a propriedade de origem do leite está em processo de certificação como livre para brucelose e o fermento

endógeno foi fornecido por uma propriedade cadastrada no programa queijo Minas artesanal do Instituto Mineiro de Agropecuária, que, por lei, deve realizar exames para brucelose periodicamente nos animais (MINAS GERAIS, 2012).

Apesar das variáveis umidade e pH apresentarem alta correlação, elas foram mantidas para os testes dos modelos de regressão pela descrição anterior na literatura que estes parâmetros podem influenciar na sobrevivência de *B. abortus* em queijos (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015). A maioria dos queijos Minas artesanais são comercializados com peso entre 800g e 1,2 kg, mas queijos menores também são encontrados no mercado (BORELLI et al., 2006). Os queijos produzidos apresentaram peso médio de 300 gramas. No entanto, apesar do menor tamanho do queijo experimental em relação à maioria dos queijos comercializados, o teor de umidade dos queijos deste estudo, comparado com o mesmo período de maturação, foi próximo aos valores encontrados em queijos maturados por 30 dias na região de Campos das Vertentes, com média de 32,6 % a 39 % (COSTA JÚNIOR et al., 2014) e também com valores semelhantes ao queijo do Serro, com umidade entre 32% e 19% de umidade entre 29 e 63 dias de maturação (MARTINS et al., 2015), respectivamente, quando, no presente estudo, *B. abortus* não estava mais viável no queijo.

A umidade do queijo está relacionada à atividade de água ( $a_w$ ), pois a redução da umidade do queijo também indisponibiliza água para o metabolismo microbiano, representada pela  $a_w$ , parâmetros com interferência na sobrevivência de *Brucella* spp. A redução da umidade durante o processo de maturação pode diminuir a viabilidade de *Brucella* spp. pela menor disponibilidade de água para o crescimento do patógeno (GILMAN; DAHLBERG; MARQUARDT, 1946; PLOMMET et al., 1988; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Menor atividade de água levou a redução mais rápida da viabilidade de *B. melitensis* em queijo tradicional de cabra, no qual, após 50 dias de maturação, a  $a_w$  de 0,87 não permitiu a sobrevivência do patógeno, enquanto, no mesmo período, em queijos com  $a_w$  de 0,90 *B. melitensis* continuou viável (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). A atividade de água também influenciou na sobrevivência de *B. abortus* na maturação de queijo de leite cru bovino, no qual a  $a_w$  reduziu de 0,98 para 0,89 em 17 dias, quando o patógeno não foi mais detectado (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015).

A queda do pH decorrente dos processos de fermentação e maturação tem sido associada a redução da viabilidade de *Brucella* spp em queijos e em outros produtos láteos (EL-DAHER; NA'WAS; AL-QADERI, 1990; ZÚÑIGA ESTRADA et al., 2005; MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). O pH dos queijos Minas artesanais comercializados variaram em de 4,6 a 5,5 (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015; CASTRO et al., 2016). Neste experimento, o pH dos queijos variou de 4,9 a 6,3 ao longo da maturação, mas esta variável não influenciou na redução de *Brucella abortus* nos queijos ao longo da maturação.

Observamos alta diversidade microbiana no leite cru, fermento endógeno e, conseqüentemente, no queijo. No entanto, microrganismos não desejáveis estavam presentes em baixas concentrações, exceto pela presença de *Staphylococcus* spp. As elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo e de CCS no leite são reflexo do estado sanitário do rebanho, e seu aumento pode ser decorrente da presença de animais com mastite subclínica no rebanho (SCHUKKEN et al., 2003). Apesar do aumento da CCS poder levar a ocorrência de alterações na composição físico-química e rendimento do leite (REIS et al., 2013; MURPHY et al., 2016), o leite empregado na produção dos queijos apresentou teores percentuais de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e extrato seco total adequados e de acordo com a legislação para produção de queijos Minas artesanais (BRASIL, 1996; MINAS GERAIS, 2002).

As contagens de *Staphylococcus* spp. nos queijos foram maiores do que no leite e fermento endógeno, demonstrando que apesar dos procedimentos de biossegurança adotados na produção do queijo ocorreu contaminação oriunda do ambiente, equipamentos, superfícies ou manipuladores (NORMANNO et al., 2007). Além disso, a tolerância desta bactéria as elevadas concentrações de cloreto de sódio e baixo pH pode propiciar a sua persistência ao longo da maturação (BAIRD-PARKER, 1990), o que foi observado nos queijos desse experimento (Figura 4. 6). Altas contagens de *Staphylococcus* spp. no leite, fermento

endógeno e queijos artesanais das diferentes microrregiões produtoras de Minas Gerais têm sido constatadas (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015; CASTRO et al., 2016). Além disso, apesar de estudos demonstrarem redução de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo ao longo da maturação (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015; SALES, 2015), *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo podem persistir em altas contagens por até 60 dias de maturação (SALES, 2015). A legislação estabelece parâmetros apenas para contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo nos queijos Minas artesanais (MINAS GERAIS, 2002; 2008); porém, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo também possui capacidade de produzir enterotoxinas, responsáveis por intoxicação alimentar em seres humanos (CARMO et al., 2002), e a persistência destes microrganismos no queijo maturado pode colocar a população em risco.

As baixas contagens de coliformes e ausência de *E. coli* no leite e fermento endógeno indicam que foram adotadas boas condições sanitárias desde a obtenção da matéria prima até o processamento do queijo na propriedade de origem do fermento endógeno (BAYLIS, 2009). No entanto, apesar dos procedimentos de biossegurança adotados na produção dos queijos a presença de coliformes e *E. coli* nesta matriz podem indicar contaminação durante o processamento ou a possibilidade que estes microrganismos estiveram presentes no leite e fermento endógeno em concentrações abaixo do limite de detecção da técnica de cultivo utilizada e, no queijo, em condições que possibilitaram a multiplicação tanto de coliformes quanto de *E. coli*, passaram a ser detectados. No entanto, as baixas contagens desses microrganismos propiciaram sua rápida eliminação ao longo da maturação (Figura 4. 6).

A alta contagem de bactérias ácido-láticas no leite, fermento endógeno e no queijo é altamente desejável por esses microrganismos atuarem na fermentação e na maturação do queijo (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Além disto, as bactérias ácido-láticas produzem substâncias com efeito antimicrobiano contra patógenos, como ácidos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). O efeito destas substâncias foi relacionado à redução de *B. abortus* em testes *in vitro* (Capítulo 3 desta tese).

A contagem de bactérias ácido-láticas em queijos Minas artesanais de Araxá também sofreu reduções após 29 dias de maturação, como observado em nosso estudo, possivelmente pela redução da umidade e do pH dos queijos (SALES, 2015). No entanto, mesmo com a morte destes microrganismos em queijos maturados por longos períodos, os efeitos benéficos das substâncias antimicrobianas produzidas podem permanecer.

A presença de bolores e leveduras em contagens altas no fermento endógeno era esperada, uma vez que os queijos da propriedade de origem deste material apresentam como característica crescimento desses microrganismos na superfície do queijo (Comunicação pessoal Mariana Resende, em junho de 2017). Bolores e leveduras são descritos com parte importante da microbiota característica dos queijos Minas artesanais e altas contagens foram encontradas no leite cru, fermento endógeno e nos queijos fresco e maturado (BORELLI et al., 2006; NÓBREGA et al., 2008; LIMA et al., 2009; CASTRO et al., 2016). A origem destes microrganismos para o leite, fermento endógeno e queijo pode ser diversa, como utensílios de produção e ambiente, sendo que condições ambientais, como temperatura e umidade relativa, e fatores do queijo, como presença de microbiota competidora e redução da atividade de água (aw), podem propiciar o desenvolvimento destes microrganismos, principalmente na superfície dos queijos (SØRHAUG, 2011). Vale lembrar que foi necessária a adição de fluconazol ao meio de cultivo para a contagem exata de colônias de *B. abortus* nos queijos para a inibição do grande crescimento de fungos nas placas de cultivo. No entanto, foi possível visualizar que os fungos e leveduras provenientes do queijo que cresceram no meio de cultura na ausência de antifúngico não impediram a visualização de *B. abortus* nas placas (dados não mostrados).

## 6.7. CONCLUSÃO

O processo de maturação foi eficiente na redução de *Brucella abortus* nos queijos Minas artesanais após 15 e 29 dias, para as concentrações iniciais de  $10^3$  e  $10^6$  UFC/mL, respectivamente.

O processo de maturação propiciou a eliminação de *E. coli* e coliformes após 8 dias e de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo em 15 dias. No entanto, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo continuou a ser detectado até ao final do período de 60 dias.

Tendo em vista a importância econômica e social do queijo Minas artesanal para Minas Gerais, o processo de maturação dos queijos por período superior a 29 dias pode contribuir com a qualidade sanitária do produto, mas não deve substituir as medidas para o controle da brucelose nos rebanhos produtores de leite utilizado na fabricação de queijo Minas artesanal.

## 6.8. REFERÊNCIAS

ALCOLÉA, V. C. *Deteção de Brucella spp. pela reação de cadeia pela polimerase em queijos Minas frescal produzidos artesanalmente na região centro oeste do estado de São Paulo*. 2011. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. 2. ed. Paris: Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), 1988.

ALVES, A. J. S.; ROCHA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; ZYLBERSZTAJN, D.; DIAS, R. A. Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the States of São Paulo and Mato Grosso, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 118, n. 4, p. 351–358, 2015.

ANDERSON-BERGMAN, C. *icenReg*: Regression models for interval censored data in R. *Journal of Statistical Software*, v. 81, n. 12, p. 23, 2017.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington, DC: APHA, 2001.

BAIRD-PARKER, A. C. *The Staphylococci: an introduction*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, v. 19, n. 1948, p. 1S–8S, 1990.

BAYLIS, C. L. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, v. 62, n. 3, p. 293–307, 2009.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 287–317, 2004.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; FRANCO, G. R.; ROSA, C. A. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 11, p. 1115–1119, 2006.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 mar. 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos*. Brasília. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos*. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Brasília, 1996.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation

of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 6, p. 1640–1642, 1995.

BRITISH STANDARDS. *Methods for Chemical Analysis of Cheese. Determination of pH value*. London, UK British Standards Institute, , 1976.

BRODIE, B. Y. J.; SINTON, G. P. Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *Journal of Hygiene (Cambridge)*, v. 74, p. 359–367, 1975.

BROOKS, P. H.; BEAL, J. D.; NIVEN, S. Liquid feeding of pigs : potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, v. 13, p. 49–64, 2001.

BROUGH, H. a; SOLOMON, A. W.; WALL, R. a; ISAZA, F.; PASVOL, G. Brucellosis acquired by eating imported cheese. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v. 47, n. 11, p. 840–1, nov. 2011.

CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; IANNACCONE, M.; ROPERTO, S.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2041–2047, 2009.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 9–14, 2002.

CARPENTER, C. M.; BOAK, R. *Brucella abortus* in milk and dairy products. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, v. 18, n. 6, p. 743–51, 1928.

CARVALHO NETA, A. V; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. a; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, v. 184, n. 2, p. 146–55, 2010.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, 2016.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P. S.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no Mercado de Queijos no Brasil. *Informações Econômicas*, v. 39, n. 6, 2009.

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; NETO, A. A. C.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. suplemento 1, p. 46–55, 2009.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. Brucellosis in humans and animals. *Geneva: World Health Organization*, 89 p., 2006.

COSTA JÚNIOR, C. G.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R.; COSTA, R. G. B.; RESENDE, E. C.; CARVALHO, K. B. A. Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo Das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 69, n. 2, p. 111, 2014.

CURTIS, G. D. W.; LEE, W. H. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, p. 1–13, 1995.

DAVIES, G.; CASEY, A. The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products. *British Veterinary Journal*, v. 129, n. 4, p. 345–353, 1973.

DEAN, A. S.; CRUMP, L.; GRETER, H.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Global burden of human Brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 10, 2012.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Atlantic V ed. Charlottetown, PE, Canada: Atlantic Veterinary College, 2003.

DONNELLY, C. W. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, v. 1, p. 541–559, 2004.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

EL-DAHER, N.; NA'WAS, T.; AL-QADERI, S. Effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 523–528, 1990

EMATER (EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS). *Caracterização na microrregião da canastra como produtora tradicional do queijo Minas artesanal*. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo\\_historico/caracterização do queijo canastra.pdf](http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracterização_do_queijo_canastra.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2017.

FARINA, F.; FUSER, R.; ROSSI, M.; SCOTTON, P. G. Outbreak di brucellosi nella provincia di Treviso da formaggio pecorino importato. *Le Infezioni in Medicina*, v. 16, n. 3, p. 154–157, 2008.

FARRELL, I. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*, v. 16, n. 3, p. 280–6, 1974.

FAY, M. P.; PAMELA, A. S. Exact and asymptotic weighted logrank tests for interval censored data: The interval R package. *Journal of Statistical Software*, v. 36, n. 2, p. 34, 2010.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

GARSON, D. G. *Generalized linear models & generalized estimating equations*. Asheboro: Statistical Publishing Associates: Kindle Edition, 2013.

GILMAN, H. L.; DAHLBERG, A. C.; MARQUARDT, J. C. The Occurrence and Survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburger Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 29, n. 2, p. 71–85, 1946.

GINN, R. E.; PACKARD, V. S.; FOX, T. L. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, v. 69, n. 3, p. 527–531, 1986.

GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTH, F.; MATOPE, G.; MUMA, J.; MARCOTTY, T.; PFEIFFER, D.; SKJERVE, E. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing

countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 241–248, 2013.

HALEKOH, U.; HØJSGAARD, S.; YAN, J. The R Package geepack for Generalized Estimating Equations. *Journal of Statistical Software*, v. 15, n. 2, 2006.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Cheese and processed cheese: determination of total solids content*. 4A. ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 1982.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Milk: determination of nitrogen content*. 20B. ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 1993.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Whole milk: determination of milk fat, protein and lactose content. guidance on the operation of mid-infrared instruments*. 141C. ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 2000.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Cheese: determination of fat content. butyrometer for van gulik method*. ISO Standa ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 2008.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Cheese and cheese products - determination of chloride content. pontetiometric titration method*. ISO Standa ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 1988.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). *Milk: enumeration of somatic cells. idf standard 148a. int. dairy fed., Brussels, Belgium*. 148A. ed. Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF), 1995.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, v. 25, n. 6, p. 745–761, 2008.

KARA, R.; AKKAYA, L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarajisar, Turkey. *British Journal of Dairy Sciences*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2013.

KUPLULU, O.; SARIMEHMETOGLU, B. Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. *Food Control*, v. 15, n. 7, p. 511–514, out. 2004.

LAGE, A. P.; POESTE, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina : uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 3, p. 202–212, 2008.

LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4–7, p. 383–398, 2001.

LAWINSKY, M. L. D. J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. D. R.; FARIA, N. D. C.; CAVALCANTE, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 4, p. 75–84, dez. 2010.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 1, p. 266–272, 2009.

LUIZ, L. M. P.; CASTRO, R. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; NUNES, A. C.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian



Minas artisanal cheese. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n. 1, p. 1–4, 2016.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 516–521, 2004.

MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 219–230, 2015.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, K. Y.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONROY, J. F.; LÓPEZ-MERINO, A.; SUÁREZ-GÜEMES, F. *Brucella melitensis* survival during manufacture of ripened goat cheese at two temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, n. 12, p. 1257–61, dez. 2011.

MENESES, J. N. C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil*. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 21 fev. 2016.

MERCK. *Reactivos, Diagnostica, Productos Quimicos 1992/1993*. Darmstadt, Germany, 1993. .

MICROSOFT CORPORATION. 2016 *Microsoft Access, versão 2016*. Parte do Microsoft Office 2016.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, v. 38, n. 6, p. 732–749, 1938.

MINAS GERAIS. *Lei nº 14.185/2002. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências*. Disponível em: <[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)>. Acesso em: 23 nov. 2010.

MINAS GERAIS. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *Decreto nº 44.864, de 1 de agosto de 2008. Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal*. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=44864&ano=2008>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1305 de 30 de Abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal*, 2013. .

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. *Portaria nº 1736 de 27/07/2017: Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal*, 2017. .

MINAS GERAIS. ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS. *Lei nº 20549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais*. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=20549&ano=2012>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

MINHARRO, S. *Isolamento, tipificação e genotipagem de brucella abortus isoladas de bovinos no Brasil*. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária., 2009.

MINISTÉRIO DA CULTURA. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Decreto nº

3.551, de 02 de outubro de 2000 - Institui o registro de bens culturais de natureza imaterial que constituem patrimônio cultural brasileiro, cria o Programa Nacional do Patrimônio Imateria. *Brasília: Ministério da Cultura, 2000.*

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Sistema de informações hospitalares do SIH/SUS*. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

MIRANDA, K. L.; POESTER, F. P.; DORNELES, E. M. S.; RESENDE, T. M.; VAZ, A. K.; FERRAZ, S. M.; LAGE, A. P. *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. *Acta Tropica*, v. 160, p. 58–61, 2016.

MIRANDA, L. L.; DORNELES, E. M. S.; PAULETTI, R. B.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: Evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*, v. 33, n. 4, p. 507–511, 2015.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 17–22, 2007.

MORALES-GARCÍA, M. R.; LÓPEZ-MÉNDEZ, J.; PLESS, R.; GARCÍA-MORALES, E.; KOSANKE, H.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; BEDI, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N.; JIMÉNEZ-ROJAS, L.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico - a comprehensive investigation. *Veterinaria Italiana*, v. 51, n. 3, p. 185–190, 2015.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. das; FERREIRA, E. M.; DOMINGO, E. do C.; SANTOS, J. P. V. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do Queijo Canastra. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 63, n. 364, p. 14–18, 2008.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, n. 3, p. 290–296, 2007.

OLIVEIRA, L. F. de; DORNELES, E. M. S.; MOTA, A. L. A. de A.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; LAGE, A. P. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Minas Gerais State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3449–3466, 2016.

PAPPAS, G.; PANAGOPOULOU, P.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, v. 63, n. 19–20, p. 2229–36, out. 2006a.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, n. 2, p. 91–99, 2006b.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G.; COURAULT, M.; MUSSET, D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait*, v. 68, n. 2, p. 115–120, 1988.

POESTER, F. C.; GONÇALVES, V. S. P.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L.; OLSEN, S. C.; SCHURIG, G. G.; LAGE, A. P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v. 24, n. 25, p. 5327–5334, 2006.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing* Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

REIS, C. B. M.; BARREIRO, J. R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M. A. de F.; SANTOS, M. V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Veterinary Research*, v. 9, 2013.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; NUNES, A. F. C. A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, 2002.

SALES, G. de A. *Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano*. Dissertação de mestrado. Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, 106 p., 2015.

SAMPAIO, I. B. M. E. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 1. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2010.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, M. D.; DIAZ-APARICIO, E.; ARELLANO-REYNOSO, B.; GARCIA-LOBO, J. M.; GIMENO, M.; PALOMARES-RESENDIZ, E. G.; HERNANDEZ-CASTRO, R. Survival of *Brucella abortus* aqpx mutant in fresh and ripened cheeses. *Foodborne Pathogens Disease*, v. 12, n. 2, p. 1–6, 2015.

SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M.; PAIXÃO, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 759–764, 2013.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, v. 34, p. 579–596, 2003.

SHAH, A. D.; BARTLETT, J. W.; CARPENTER, J.; NICHOLAS, O.; HEMINGWAY, H. Comparison of random forest and parametric imputation models for imputing missing data using MICE: A CALIBER study. *American Journal of Epidemiology*, v. 179, n. 6, p. 764–774, 2014.

SHEN, C. W.; CHEN, Y. H. Model selection of generalized estimating equations with multiply imputed longitudinal data. *Biometrical Journal*, v. 55, n. 6, p. 899–911, 2013.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; NETO, J. S. F.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. SUPP.1, p. 118–125, 2009.

SØRHAUG, T. Spoilage molds in dairy products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, p. 780–784, 2011.

STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, P. H. F. da; PAULA, J. C. J. de; TELLES, E. O. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3743, 2016.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n. 358, p. 36–48, 2000.

THERNEAU, T. *A package for survival analysis in S*. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

VAN BUUREN, S.; GROOTHUIS-OUDSHOORN, K. mice : Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software*, v. 45, n. 3, 2011.

VERGER, J. M. Comparaison des doses infectieuses 50P.100 (DI 50) de *Brucella melitensis* inoculée par les voies conjonctivale, intragastrique et intrapéritonéale a la souris. *Annales de Recherches Vétérinaires*, v. 2, n. 2, p. 185–196, 1991.

WARETH, G.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; NEUBAUER, H.; ROESLER, U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 10, p. 1339–1343, 2014.

WHITE, I. R.; ROYSTON, P.; WOOD, A. M. Multiple imputation using chained equations: Issues and guidance for practice. *Statistics in Medicine*, v. 30, n. 4, p. 377–399, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Brucellosis (human)*. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/brucellosis/en/>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

WRIGHT, K. *corrgram: Plot a Correlogram. R package*. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=corrgram>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

ZÚÑIGA ESTRADA, A.; MOTA DE LA GARZA, L.; SÁNCHEZ MENDOZA, M.; SANTOS LÓPEZ, E. M.; FILARDO KERSTUPP, S.; LÓPEZ MERINO, A. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 47, n. 3–4, p. 88–91, 2005.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ingestão de produtos lácteos, principalmente queijos frescos, tem sido associado a ocorrência de brucelose em seres humanos em todo mundo. O queijo Minas artesanal, por ser produzido com leite cru é potencial veículo deste patógeno para seres humanos. Este produto contribui para o desenvolvimento sociocultural e econômico do estado de Minas Gerais e, apesar dos grandes esforços para sua regulamentação, uma considerável parcela da produção e comercialização é realizada de forma informal, com período de maturação menor que o determinado na legislação atual. Vale ressaltar que a legislação não contempla a pesquisa de *B. abortus* nos queijos Minas artesanais comercializados e não se sabe a real importância da veiculação deste patógeno pela ingestão deste produto. Também não há conhecimento a respeito da prevalência de brucelose nas propriedades produtoras de queijo no estado de Minas Gerais.

Os ensaios de antagonismo *in vitro* demonstraram a capacidade de amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais de diferentes regiões antagonizarem *B. abortus*. Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que tais microrganismos podem contribuir para a segurança e conservação dos queijos Minas artesanais. No entanto, o fato das amostras de bactérias ácido-láticas testadas mostrarem diferenças nos experimentos conduzidos quanto ao crescimento e produção de substâncias de efeito antimicrobianos, e por estudos *in vitro* apresentarem limitações práticas, pesquisas futuras devem ser conduzidas para avaliar a viabilidade de *B. abortus* em queijo Minas artesanal inoculado com as amostras de bactérias ácido-láticas testadas e ainda, com amostras oriundas de outras microrregiões produtoras, que não foram utilizadas no presente trabalho.

A maturação de 29 dias é fundamental para reduzir o risco quanto a presença de *B. abortus* em queijos Minas artesanais, proporcionando uma maior segurança para os consumidores. Trabalhos de educação sanitária devem ser realizado com a população, para conscientização quanto aos riscos do consumo de queijos frescos e de origem desconhecida, sendo de suma importância incentivar o consumo de queijos maturados proveniente de produtores cadastrados no programa queijo Minas artesanal, executado pelo EMATER e IMA, que se esforçam para oferecer um produto de qualidade e de baixo risco ao consumidor.

Estudos futuros devem ser realizados com amostras de campo, circulantes nas regiões produtoras e fermento endógeno de outras mesorregiões produtoras de queijo Minas artesanal, ampliando a representatividade prática do experimento que avaliou o efeito da maturação na sobrevivência de *B. abortus*. Adicionalmente estudos da prevalência da brucelose em queijos comercializados no Estado coletado diretamente nas propriedades produtoras de queijo Minas artesanal contribuiriam para o conhecimento da sobrevivência do patógeno em condições de campo.

Ressalta-se ainda a colaboração de órgãos de defesa sanitária e inspeção de produtos de origem animal, com órgãos de extensão rural e assistência técnica deve ser estimulada para que se possa adotar medidas de controle da brucelose nos rebanhos, com necessidade de maiores investimentos em recursos por parte do Estado para permitir a eliminação de animais infectados e proporcionar educação sanitária aos produtores a respeito da importância do controle da brucelose nos rebanhos. Enfatizamos ainda que propriedades produtoras de queijo Minas artesanal devem ser estimuladas a adesão ao Programa de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), e a certificar estas propriedades como livres da doença, o que contribuiria com a segurança sanitária dos queijos produzidos.

Por fim, ressaltamos que o processo de maturação muitas das vezes é visto como uma forma de melhoria da qualidade sanitária dos queijos produzidos com leite cru, mas este processo na realidade deve ser adotado em função de propiciar modificações nas características sensoriais do produto, intensificando seu sabor. Desta forma a maturação é uma medida complementar a qualidade sanitária das matérias-primas, principalmente em relação a obtenção do leite de animais saudáveis, adoção de práticas de higiene durante ordenha, bem como durante a comercialização dos queijos. Em conjunto, tais práticas contribuem para a inocuidade do produto.