

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**INFLUÊNCIA DO ANTAGONISMO POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E
DA MATURAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DE *Mycobacterium bovis* BCG EM
QUEIJOS TIPO MINAS ARTESANAL**

LETÍCIA GOULART DE OLIVEIRA

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2018**

Letícia Goulart de Oliveira

**INFLUÊNCIA DO ANTAGONISMO POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E
DA MATURAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DE *Mycobacterium bovis* BCG EM
QUEIJOS TIPO MINAS ARTESANAL**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Professor Marcelo Resende de Souza

Co-orientadores: Professor Andrey Pereira Lage e Professor Álvaro Cantini Nunes

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2018**

O481 Oliveira, Letícia Goulart de. 1983-
Influência do antagonismo por bactérias ácido-láticas e da maturação sobre a viabilidade de *Mycobacterium bovis* BCG em queijos tipo Minas artesanal / Letícia Goulart de Oliveira. – 2018.
135p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza
Co-orientadores: Andrey Pereira Lage, Álvaro Cantini Nunes
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

I. Queijo de Minas – Análise – Teses. 2. Queijo de Minas – Microbiologia – Teses. 3. Queijo de Minas – Qualidade – Teses. 4. Queijo de Minas – Estudos experimentais – Teses. 5. Bactérias produtoras de ácido-lático – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de. II Nunes, Álvaro Cantini. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

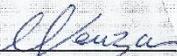
CDD – 637.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA GOULART DE OLIVEIRA

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 Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

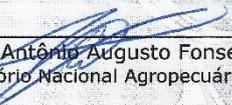
Aprovada em 31 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



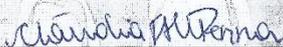
Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente – Orientador



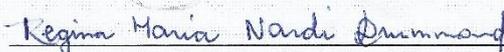
Prof.ª Evelise Oliveira Telles
Universidade de São Paulo - USP



Dr. Antônio Augusto Fonseca Junior
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO



Prof.ª. Claudia Freire de Andrade Moraes Penna
Escola de Veterinária - UFMG



Prof.ª. Regina Maria Nardi Drummond
Instituto de Ciências Biológicas - ICB-UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 – CEP 30123-970
Belo Horizonte – Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



Escola de Veterinária
UFMG

"Fome de tudo – de conhecer por dentro – fome do miolo todo,
do bagaço, da última gota de caldo."

Guimarães Rosa em Noites do Sertão

“Somos o resultado de tanta gente, de tanta história, tão grandes sonhos que vão passando de pessoa em pessoa, que nunca estaremos sós”

valter hugo mãe em o filho de mil homens.

Sou o resultado da minha mãe e do meu pai, Myriam e Márcio. Obrigada, obrigada, obrigada.

Estiveram comigo nessa caminhada do doutorado:

Meu orientador, o professor Marcelo Resende de Souza. Aceitou minha pesquisa, me apoiou nos momentos difíceis e confiou no meu trabalho. Obrigada pelos seis anos de ensinamento.

Minha irmã Emília. “O presente é tão grande, (...) vamos de mãos dadas”.

Meus co-orientadores professor Andrey Pereira Lage e professor Álvaro Cantini Nunes.

A professora Cláudia Morais Penna. Aqui é minha primeira resposta à sua pergunta, feita ainda em 2012, sobre *M. bovis* em queijo Minas artesanal. Sua curiosidade atçou a minha.

Os demais professores do DTIPOA.

Os funcionários do DTIPOA, Maura Moura, Cosme Barbosa, Milton Jesus, Marco Antônio Guerra e César Gontijo. Meu trabalho nada seria sem a ajuda de vocês.

Minha cunhada Luana. Ramos de risos na família Oliveira!

Minhas primas Daniela, Fernanda, Laura, Maíra, Laura, Rachel, Fabíola, Raquel e Sophia.

Meu afilhado Martim, Timtim, Martinico, Timtimzura, tantos nomes para o amor.

Minhas grandes amigas, de antes e para o futuro. Thalita Mourão Annoni, Clarice Mendonça, Sílvia Simões, Sílvia Alves Rosso, Flávia Dalle, Alessandra Lemos; Daniela Rajão, Juliana Batista, Flávia Cruz, Fernanda Vigorito e Marcela Bemfeito.

Minhas amigas da pós-graduação, mulheres fortes que o queijo colocou no meu caminho. Renata Castro, Lívia Luiz e Gabriela Silva, obrigada.

Meus queridos amigos Felipe Sant’anna, Cosme Barbosa e Givanildo Silva.

Minhas amigas e meus amigos da pós-graduação, Naiara Figueiredo, Ethiene Santos, Isabela Lanza, Talita Batista, Carla Soares, Renata De Paoli, Cristiane Guimarães, Dalila Oliveira, Leonardo Acurcio, Ranier Figueiredo, Gilson Sales, Breno Curty, Sávio Sandes, Rafael Bastos e Danilo Oliveira.

Minha família, em especial Maurício e Dili, Ernesto e Chico.

O Lucas Mortimer, que me falou de música enquanto eu falava de queijo.

A Débora Amarante, minha analista.

Os pequenos Flávio, Sophia, Miguel, Francisco, Tomás, Lucas, Martim, Maria, Ágatha e Aruã. Alice, Guilherme, Maria, Henrique e Stella. João, Lucas e Gustavo. Que vocês acreditem na ciência e nas pessoas e que vocês mudem o mundo.

Mitilini e Rosinha e o Clube Atlético Mineiro.

Agradeço

À banca.

Ao LANAGRO, nas pessoas de Antônio Fonseca Junior e Paulo Soares Filho.

Aos produtores de queijo Minas artesanal. Que a produção de queijo Minas artesanal continue forte e viva.

Aos produtores Valéria e Allan, do queijo Dinho da Serra da Canastra, pelo fornecimento do pingo.

Ao IMA, na pessoa de Gilson Sales, pelo apoio nas coletas de pingo.

À EPAMIG, na pessoa de Cristiane Guimarães, por fornecer o leite do experimento.

Ao LabUFMG, por analisar o leite.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao CNPQ.

À FAPEMIG.

À sociedade brasileira, por ter arcado com minha graduação e pós-graduação.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	
1.	INTRODUÇÃO GERAL	18
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	Objetivo geral	19
2.2.	Objetivos específicos	19
3.	CAPÍTULO I - Revisão de Literatura	20
3.1.	O queijo Minas artesanal	20
3.1.1	Histórico geral	20
3.1.2	Definição	21
3.1.3	Legislação	21
3.1.4.	Âmbito social e econômico	22
3.1.5	Características microbiológicas e físico-químicas	23
3.1.6	Maturação	25
3.2	Bactérias ácido-láticas	26
3.2.1	Os micro-organismos	26
3.2.2	BAL isoladas de queijo Minas artesanal	26
3.3	<i>Mycobacterium bovis</i>	27
3.3.1	O micro-organismo	27
3.3.2	Tuberculose bovina	28
3.3.3	Prevalência da doença em animais	29
3.3.4	Legislação	31
3.3.5	<i>Mycobacterium bovis</i> em leite e derivados lácteos	32
3.3.6	Tuberculose zoonótica	34
3.3.7	Prevalência da doença em humanos	35
3.3.8	Fatores de risco para tuberculose zoonótica	36
3.3.9	Interação <i>M. bovis</i> x BAL x produtos lácteos	38
3.3.9.1	pH e ácidos orgânicos	39
3.3.9.2	Umidade	39
3.3.9.3	Concentração de sal	40
3.3.9.4	Microbiota competidora	40
3.3.9.5	Bacteriocinas	40
3.3.10	<i>Mycobacterium bovis</i> x maturação de queijos	43
3.3.11	Formas de controle para tuberculose zoonótica	44
4	CAPÍTULO II – Bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal e seus antagonismos in vitro contra <i>Mycobacterium bovis</i> BGC	47
4.1	Introdução	47
4.2	Material e métodos	48
4.2.1	Bactérias ácido-láticas e condições de cultura	48
4.2.2	<i>Mycobacterium bovis</i> e condições de cultura	49
4.2.3	Atividade antagonista <i>spot-on-the-lawn</i>	50
4.2.4	Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas em leite fermentado	50
4.2.5	Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas em caldo 7H9	50
4.2.6	Atividade antagonista de sobrenadante de bactérias ácido-láticas	50
4.2.7	Enumeração bacteriana	50
4.3	Resultados e discussão	51

4.4	Conclusões	55
4.5	Agradecimentos	56
5	CAPÍTULO III – Influência da maturação sobre a viabilidade de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG em queijos tipo Minas artesanal	57
5.1	Introdução	57
5.2.	Material e métodos	57
5.2.1.	Tratamentos	57
5.2.2.	Origem de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG, <i>Lactobacillus paracasei</i> B7 e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> D1	57
5.2.3.	Curva de crescimento	58
5.2.3.1.	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	58
5.2.3.2.	Bactérias ácido-láticas	58
5.2.4.	Produção de inóculo	59
5.2.4.1.	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	59
5.2.4.2.	Bactérias ácido-láticas	60
5.2.5.	Análises microbiológicas de leite e soro-fermento.....	60
5.2.5.1.	<i>Mycobacterium bovis</i>	60
5.2.5.2.	Coliformes totais (a 30°C) e coliformes termotolerantes (a 45°C)	60
5.2.5.3.	Bactérias ácido-láticas	60
5.2.5.4.	<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positive	60
5.2.5.5.	Fungos.....	61
5.2.5.6.	<i>Salmonella</i> spp.	61
5.2.6.	Análises físico-químicas, de contagem bacteriana total e de contagem de células somáticas de leite cru	61
5.2.7.	Produção de queijo tipo Minas artesanal	62
5.2.8.	Maturação de queijo tipo Minas artesanal	65
5.2.9.	Análises microbiológicas e físico-químicas de soro de queijo e queijo tipo Minas artesanal	66
5.2.9.1.	Análise de <i>M. bovis</i> BCG	66
5.2.9.1.1	Descontaminação	66
5.2.9.1.2.	Cultura	67
5.2.9.1.3.	Coloração de Ziehl-Neelsen	68
5.2.9.2.	Análise de BAL, coliformes a 30°C e a 45°C, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo, fungos e <i>Salmonella</i> spp. de queijo tipo Minas artesanal	68
5.2.9.3.	Análises físico-químicas de queijo tipo Minas artesanal	68
5.2.10.	Descarte de material contaminado	69
5.2.11.	Análise estatística	69
5.3.	Resultados e discussão	69
5.3.1.	Curva de crescimento	69
5.3.2.	Produção de inóculo	71
5.3.3.	Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru e microbiológica de soro-fermento	71
5.3.4.	Contagem de <i>M. bovis</i> BCG em soro de queijo	74
5.3.5.	Condições de cultivo de <i>M. bovis</i> BCG isolados de queijo tipo Minas artesanal	74
5.3.6.	Qualidade microbiológica e físico-química de queijo tipo Minas artesanal	76
5.3.7.	Comparação tratamentos A, B e C para viabilidade de <i>M. bovis</i> BCG ao longo da maturação em queijo tipo Minas artesanal	80

5.3.8.	Sobrevivência de <i>M. bovis</i> BCG e viabilidade de BAL ao longo da maturação nos tratamentos A, B e C	83
5.3.9.	Correlação entre parâmetros microbiológicos e contagem de <i>M. bovis</i> BCG dos tratamentos A e B ao longo da maturação de queijo tipo Minas artesanal	85
5.3.10.	Correlação entre parâmetros físico-químicos e contagem de <i>M. bovis</i> BCG dos tratamentos A e B ao longo da maturação queijo tipo Minas artesanal	92
5.4.	Conclusões	102
6.	Considerações finais	103
7.	Referências bibliográficas	104
8.	Anexo I	127

LISTA DE TABELAS

	CAPÍTULO I	20
Tabela 3.1 -	Parâmetros e padrões para inspeção de queijo Minas artesanal definidos pelo Decreto 62.645 de 2002	24
Tabela 3.2 -	Estudos com caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal.....	24
Tabela 3.3 -	Espécies de BAL encontradas em queijo Minas artesanal	27
Tabela 3.4 -	Fatores de risco de tuberculose em bovinos	29
Tabela 3.5 -	Prevalência de tuberculose bovina em rebanhos em Minas Gerais nos anos de 2001 e 2016 em função das regiões produtores de queijo Minas artesanal (QMA)	31
Tabela 3.6 -	Trabalhos que relatam a identificação de <i>Mycobacterium</i> spp. em leite no Brasil	33
Tabela 3.7 -	Bacteriocinas testadas contra micro-organismos do gênero <i>Mycobacterium</i>	41
Tabela 3.8 -	Produtos lácteos suplementados com BAL e bactérias do gênero <i>Mycobacterium</i> com redução na concentração do patógeno	42
	CAPÍTULO II	47
Tabela 4.1 -	Designação, espécies, origem e referência das bactérias ácido-láticas	49
Tabela 4.2 -	Contagens médias de <i>M. bovis</i> BCG em ágar 7H11 e de BAL em ágar MRS após cinco dias de crescimento concomitante em leite desnatado fermentado	52
Tabela 4.3 -	Contagens médias de <i>M. bovis</i> BCG em ágar 7H11 e de BAL em ágar MRS após cinco dias de crescimento concomitante em caldo 7H9	53
Tabela 4.4 -	Contagens médias (\log_{10} CFU mL ⁻¹) de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG em 7H11 após cinco dias de crescimento em sobrenadante (caldos 7H9 e MRS) autoclavados ou filtrado de BAL	54
	CAPÍTULO III	57
Tabela 5.1 -	Concentração média de inóculos bacterianos para produção de queijo tipo Minas artesanal	71
Tabela 5.2 -	Valores médios microbiológicos e físico-químicos de leite cru e parâmetros microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pelas Leis nº19.492 de 2011 e nº 20.549 de 2012 e pelos Decretos 42645 de 2002 e 44.864 de 2008	72
Tabela 5.3 -	Resultados médios de análises microbiológicas de soro-fermento coletado em propriedade cadastrada pelo IMA na Serra da Canastra para produção de queijo tipo Minas artesanal (UFC/mL)	73
Tabela 5.4 -	Contagem média de <i>M. bovis</i> BCG em soro de queijo após produção de queijo tipo Minas artesanal, coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/mL)	74
Tabela 5.5 -	Enumeração média de <i>M. bovis</i> BCG e BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento A ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	76
Tabela 5.6 -	Enumeração média de <i>M. bovis</i> BCG e BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento B ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	77
Tabela 5.7-	Enumeração média de BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento C ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	78
Tabela 5.8 -	Viabilidade de <i>M. bovis</i> e MAP em queijos experimentais ao longo da maturação	79

Tabela 5.9 - Parâmetros microbiológicos médios (UFC/g), coeficientes de variação (%) e intervalos de confiança (95%) (UFC/g) de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	84
Tabela 5.10 - Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros microbiológicos médios de amostras de queijo Minas artesanal durante 90 dias de maturação a 22°C e as contagens médias de <i>M. bovis</i> BCG dos tratamentos A e B	85
Tabela 5.11 - Resultados médios de análises físico-químicas, seus coeficientes de variação (%) e seus intervalos de confiança de amostras de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	91
Tabela 5.12 - Resultados médios de análises físico-químicas, seus coeficientes de variação (%) e seus intervalos de confiança de amostras de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias	91
Tabela 5.13 - Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros físico-químicos de amostras de queijo Minas artesanal durante 90 dias de maturação a 22°C e as contagens de <i>M. bovis</i> BCG dos tratamentos A e B	92

LISTA DE FIGURAS

	CAPÍTULO I	20
Figura 3.1 -	Mapa das regiões reconhecidas como produtoras de queijo Minas	22
Figura 3.2 -	Prevalência de rebanhos infectados por <i>M. bovis</i> em Minas Gerais em 2013	30
	CAPÍTULO III	57
Figura 5.1 -	Fluxograma de produção de queijo Minas artesanal	63
Figura 5.2 -	Aquecimento do leite cru com ebulidor até atingimento da temperatura de 37°C	64
Figura 5.3 -	Inóculos de <i>L. paracasei</i> B7 e <i>L. rhamnosus</i> D1	64
Figura 5.4 -	Inóculos de <i>M. bovis</i>	64
Figura 5.5 -	Adição de soro-fermento no leite cru	65
Figura 5.6 -	Adição de coalho no leite cru	65
Figura 5.7 -	Corte da massa com lira em aço inox	65
Figura 5.8 -	Recuperação e enformagem dos coágulos	65
Figura 5.9 -	Maturação de queijos tipo Minas artesanal em B.O.D	66
Figura 5.10 -	Descontaminação das amostras de queijos por HPC em tubo Falcon estéril	67
Figura 5.11 -	Colônias de <i>M. bovis</i> BCG sobre ágar 7H11	68
Figura 5.12 -	Curva de crescimento com contagem média de <i>M. bovis</i> BCG por sete dias em caldo 7H9	70
Figura 5.13 -	Curva de crescimento com contagem de <i>L. paracasei</i> B7 e pH por 24 horas em caldo MRS	70
Figura 5.14 -	Curva de crescimento com contagem de <i>L. rhamnosus</i> D1 e pH por 24 horas em caldo MRS	71
Figura 5.15 -	Comparação entre colônias típicas de <i>M. bovis</i> BCG em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C	75
Figura 5.16 -	Comparação entre colônias típicas de micro-organismos contaminantes em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C	75
Figura 5.17 -	Comparação entre coloração de Ziehl-Neelsen das colônias crescidas em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C	76
Figura 5.18 -	Comparação entre coloração de Gram das colônias crescidas em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C	76
Figura 5.19 -	Variação na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG nos tratamentos A, B e C de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	81
Figura 5.20 -	V. Variação na contagem média de BAL nos tratamentos A, B e C de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	82
Figura 5.21 -	. Variação na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG e BAL (tratamento A) em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	83
Figura 5.22 -	Variação na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG e BAL (tratamento B) em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	82
Figura 5.23 -	Variação na contagem média de BAL (tratamento C) de 24 amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	84
Figura 5.24 -	Variação na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e coliformes a 30°C e a 45°C em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	88
Figura 5.25 -	Variação na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e coliformes a 45°C em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	89

Figura 5.26 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	90
Figura 5.27 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e fungos em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	91
Figura 5.28 -	Contaminação de placas de ágar 7H11 por fungos	92
Figura 5.29 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na concentração de ácido láctico amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	95
Figura 5.30 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e em pH amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	96
Figura 5.31 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de umidade de amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	97
Figura 5.32 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de extrato seco total de amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	98
Figura 5.33 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de extrato seco desengordurado em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	100
Figura 5.34 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de gordura em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	100
Figura 5.35 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de proteína em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	101
Figura 5.36 -	Varição na contagem média de <i>M. bovis</i> BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de cloreto de sódio em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias	102

LISTA DE ABREVIATURAS

A.E.C.	Antes da Era Comum
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Aw	Atividade de Água
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
BCG	Bacilo Calmette–Guérin
BHI	Caldo infusão coração-cérebro
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
BPLS	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CV	Coefficiente de Variação
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
EUA	Estados Unidos da América
EV	Escola de Veterinária
fg	fentograma
FQ	Físico-química
g	Gramma
g	Intensidade de aceleração
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPC	cloreto de hexadecilpiridínio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IPHAN	Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
L	Litro
LabUFMG	Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG
M	Microbiológico
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por desorção-ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo
MAP	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
m-PCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
MTC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Oleico Albumina Dextrose Catalase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
PCR (PRA)	Polymerase Chain Reaction - Polimorfismo de comprimento de restrição

PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
PT	Proteína Total
QMA	Queijo Minas Artesanal
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
spp.	Todas as espécies de um mesmo gênero
t	Tonelada
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFC	Unidade Formadora de Colônia
°C	Graus centígrados
μL	microlitro
μm	micrómetro

RESUMO

O consumo de leite cru e seus derivados é considerado um dos principais fatores de risco associados à tuberculose zoonótica, causada por *Mycobacterium bovis*. No estado de Minas Gerais, o queijo Minas artesanal é o principal produto lácteo artesanal, feito a partir de leite cru e em propriedades rurais. Bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo de micro-organismos originários de produtos lácteos que, além de apresentar funções tecnológicas, também exibem atividade antagonista contra micobactérias. O objetivo desse trabalho foi: (I) avaliar a atividade antagonista *in vitro* de BAL isoladas de queijo Minas artesanal contra *M. bovis* BCG; (II) isolar e quantificar *M. bovis* BCG em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação controlada. No ensaio *in vitro*, foram testadas nove bactérias ácido-láticas em cinco provas *in vitro* contra *M. bovis* BCG: antagonismo “spot-on-the-lawn”, atividade antagonista em caldo 7H9 e leite fermentado e atividade antagonista de sobrenadante filtrado ou autoclavado de BAL. Os micro-organismos *Lactobacillus paracasei* A1C, *Lactobacillus rhamnosus* D1C, *Lactobacillus plantarum* 1CV e *L. plantarum* 56CV demonstraram os melhores resultados em todos os ensaios. Características intrínsecas a esses lactobacilos, como taxa de crescimento e produção de ácido e bacteriocinas, podem ter sido responsáveis pela diminuição significativa de *M. bovis* BCG. A viabilidade de *M. bovis* BCG também foi testada em queijos tipo Minas artesanal, feito a partir de leite cru e soro-fermento, ao longo de 90 dias de maturação. Foram estudados três tratamentos distintos: queijos controle, queijos com adição de *M. bovis* BCG e queijos com adição de *M. bovis* BCG e *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. As análises foram feitas nos dias 1, 8, 15, 22, 29, 45, 60 e 90 pós-produção. Foram avaliados os seguintes parâmetros ao longo da maturação: contagens de BAL, *M. bovis* BCG, coliformes a 30°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, fungos; presença de *Salmonella* spp.; pH; concentrações de ácido lático, umidade, extrato seco total e desengordurado, gordura, proteína e cloreto de sódio. *M. bovis* BCG não foi detectado apenas após 45 dias nos queijos com adição de BAL e após 60 dias nos queijos do tratamento sem BAL. Os principais fatores relacionados à redução da micobactéria foram a presença de BAL e a diminuição da umidade do produto.

Palavras-chave: queijo Minas artesanal; Mycobacterium bovis BCG; bactérias ácido-láticas

ABSTRACT

The consumption of raw milk and its products is considered one of the main risk factors associated with zoonotic tuberculosis in humans, a disease caused by *Mycobacterium bovis*. In the state of Minas Gerais, Minas artisanal cheese is the main artisanal dairy product, and is made from raw milk in rural properties in the countryside. Lactic acid bacteria (LAB) are a group of microorganisms derived from milk and its products which present inhibitory activity against pathogens, including mycobacteria. The aim of this study was: (I) to assess *in vitro* antagonistic activity of LAB isolated from Brazilian Minas artisanal cheese against *M. bovis* BCG; (II) to isolate and to quantify *M. bovis* BCG in experimental Minas artesanal cheese during controlled ripening. In the *in vitro* analysis, nine LAB were tested against *M. bovis* BCG on five different assays: spot on the lawn; antagonistic activity in 7H9 broth and in fermented milk, and antagonistic activity of LAB supernatants. *L. paracasei* A1C, *L. rhamnosus* D1C, *L. plantarum* 1CV and *L. plantarum* 56CV demonstrated better antagonistic activity in all assays. This could be due to their own characteristics such as growth rate, acid and bacteriocin production. *Mycobacterium bovis* BCG viability was also tested in Minas artesanal cheeses during ripening for 90 days. Cheeses were made according to three different treatments: control treatment, cheeses with *M. bovis* BCG and cheeses with *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *M. bovis* BCG. The analysis were performed on days 1, 8, 15, 22, 29, 45, 60 and 90 after the cheeses production. The following parameters were examined throughout the ripening period: counts of LAB, *M. bovis* BCG, coliforms at 30°C and 45°C, *Staphylococcus* spp., coagulase-positive *Staphylococcus*, fungi; presence of *Salmonella* spp.; pH; concentrations of lactic acid, moisture, total dry matter, defatted dry matter, fat, protein and sodium chloride. The micobacteria was not detected only after 45 days in cheeses with LAB and 60 days in cheeses without LAB. The main factors associated with the absence of the micobacteria were the presence of LAB and the decline of the moisture content of the cheese.

Key-words: Minas artisanal cheese; Mycobacterium bovis BCG; lactic acid bacteria

1. Introdução geral

O queijo artesanal, presente como alimento do homem há milênios, tem tido sua reputação questionada quanto à sua inocuidade. Testemunhas da história, da cultura e do estilo de vida das comunidades que os produzem, os queijos tradicionais se veem em um embate entre segurança alimentar e sua valorização e preservação (Licitra, 2010). No estado de Minas Gerais, Brasil, o principal queijo artesanal é denominado de Minas artesanal.

O estado é, reconhecidamente, o mais tradicional elaborador de queijos no país e apresenta o segundo maior rebanho bovino e é o principal produtor de leite, com cerca de 24 milhões de cabeças e 9,3 bilhões de litros de leite/ano (Instituto Brasileiro..., 2013). Em relação à agricultura familiar, conta com 437 mil estabelecimentos, divididos em uma área de cerca de nove milhões de hectares (Empresa Brasileira, 2011...; Netto, 2012). O queijo Minas artesanal, ainda que competindo com o queijo Minas industrializado, demonstra que tem força no âmbito econômico. Pelo estado, são cerca de nove mil produtores envolvidos na produção de queijo Minas artesanal (QMA), com produção superior a 29 mil toneladas por ano e geração de 26 mil empregos diretos. Dentre esse universo de produtores, 247 estão cadastrados no programa Queijo Minas Artesanal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER – MG) (Empresa de Assistência..., 2013; Instituto Mineiro..., 2015).

O leite a ser utilizado na elaboração do queijo artesanal deve ser, de acordo com a Lei 20.549 (Minas Gerais, 2012) desprovido de tratamento térmico. Se a matéria prima apresentar baixas contagens bacterianas e for livre de patógenos, o queijo não oferece risco aos consumidores (Henri-Dubernet, Desmasures e Guéguen, 2004). Entretanto, se não forem respeitadas as normas de boas práticas de ordenha e fabricação, além da sanidade do rebanho, esse produto pode apresentar patógenos como *Mycobacterium* spp. e outros (Bertoni *et al.*, 2001). Em diversos estudos com queijos artesanais em Minas Gerais, foram encontradas contagens variadas de coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positivo, além de presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Resende *et al.*, 2011, Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2015). No entanto, não há relatos de pesquisa para *Mycobacterium* spp. em queijo Minas artesanal.

A doença causada por *Mycobacterium bovis* é considerada uma zoonose com sérias implicações para a saúde humana (Organização..., 2008). As principais formas de transmissão são por exposição ocupacional ao patógeno e por consumo de leite contaminado e seus derivados (Dankner e Davis, 2000). Não há, entretanto, registros da prevalência e da incidência dos casos de tuberculose humana causada por *Mycobacterium bovis* e também do impacto econômico causado por esta doença no país (Jorge, 2011).

No Brasil, a situação epidemiológica de distribuição da tuberculose bovina é heterogênea. A prevalência nacional da doença em bovinos é de 1,3% (Ministério da Agricultura..., 2006). No estado de Minas Gerais, a prevalência é de 5% e 0,9% para rebanhos e animais positivos, respectivamente (Barbieri *et al.*, 2016).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Isolar e quantificar *M. bovis* BCG em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação controlada e avaliar efeito inibitório de bactérias ácido-láticas e de transformações bioquímicas contra este patógeno.

2.2. Objetivos específicos

Estudar o antagonismo *in vitro* de bactérias ácido láticas, isoladas de queijo Minas artesanal, contra *M. bovis* BCG.

Acompanhar a viabilidade de *M. bovis* BCG e a composição química em queijo tipo Minas artesanal durante maturação sob temperatura e umidade controladas.

Determinar a influência de bactérias ácido-láticas, isoladas de queijos Minas artesanais, na viabilidade de *M. bovis* BCG em queijo tipo Minas artesanal durante maturação sob temperatura e umidade controladas.

3. Capítulo I – Revisão de literatura

3.1. O queijo Minas artesanal

3.1.1. Histórico geral

Queijo é o nome genérico dado a um grupo de produtos lácteos fermentados. Acredita-se que seu primeiro exemplar tenha surgido na região do Crescente Fértil há 8.000 anos, entre os rios Tigre e Eufrates, onde hoje é o Iraque. Seu aparecimento está associado à domesticação de animais, principalmente cabras e ovelhas, e ao aproveitamento de seus produtos. Os alimentos fermentados pioneiros surgiram, assim, de uma combinação ao acaso de temperatura ideal e presença de bactérias ácido-láticas no leite acondicionado em estômago de ruminantes. Havia coagulação do leite com formação de um gel que, após movimentação intencional ou não, era quebrado em coágulo e soro (Fox *et al.*, 2004).

Materiais depositados em uma tumba, entre 3.100 e 2.900 A.E.C., no Egito antigo, foram identificados como queijo por arqueólogos. Essas são, portanto, as primeiras evidências concretas da produção de queijo por povos antigos. Na Grécia antiga, a produção de queijo de ovelha foi descrita por Homero na obra *A Ilíada*, no século VII A.E.C. Diodorus, no século I A.E.C., discorre sobre a lenda de Aristeus, filho de Apolo, que aprendeu a arte da produção de queijo e repassou o conhecimento para a população grega. Estima-se que, na Europa ocidental, a produção de queijos se iniciou como decorrência do Império Romano, que trouxe a tecnologia de fabricação da Grécia. Registros sobre tais produtos, entretanto, só estão disponíveis a partir da Idade Média. A América e seus povos não utilizavam nenhum tipo de leite até serem colonizados pelas metrópoles europeias, a partir do século XVI. Países orientais, incluindo Japão, Índia e China permaneceram sem leite e queijo até os tempos modernos quando, sob a influência da globalização, passaram a produzir e consumir derivados lácteos (Dalby, 2009; Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 2011).

No Brasil, durante o período colonial, o queijo entrava no país como produto importado da metrópole e recebia o nome de flamengo. Registros de navios entre Portugal e o Brasil, no século XVIII, evidenciavam o comércio. Alguns desses produtos originavam-se também da Inglaterra, parceira comercial do reino português (Barbosa, 1971; Pinto, 1979).

Acredita-se que o queijo passou a ser produzido no Brasil com a vinda da família real portuguesa, em 1808. Seu formato inicial era como queijo do Reino (derivado de “queijo que veio do reino”), de massa prensada, semiduro e sabor suave. Como adjuvantes no processo de coagulação, no Brasil, eram utilizados estômagos de animais nativos, como anta, veado e tatu canastra, uma vez que os fazendeiros se recusavam a abater bezerras para a obtenção do coalho (Pinto, 1979; Albuquerque, 1986; Dias, 2006).

Atualmente, destacam-se no país os seguintes queijos artesanais, feitos a partir de leite cru:

- Serrano e Colonial: produzidos em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, a partir de leite de rebanhos de corte (Menezes, 2011);
- Minas artesanal, meia-cura, cabacinha e requeijão: de Minas Gerais, diferem-se pela adição de cultura láctica, aquecimento da massa e tempo de maturação (Minas Gerais, 2012);
- Coalho, requeijão: produzidos no nordeste do país, são queijos de alta umidade e pouco maturados (Guedes Neto, 2008);

- Marajó: queijo tipo manteiga, feito a partir de leite de búfala e de vaca, de média umidade (Seixas *et al.*, 2015).

Como características comuns da produção dos queijos artesanais brasileiros, destacam-se um caráter pouco especializado, produção familiar e sazonal e de pequeno volume (Almeida, 2001). Deve-se reconhecer, entretanto, que a elaboração de queijos artesanais está intimamente conectada e adaptada à sua origem e, com isso, contribui para a permanência e manutenção do agricultor no ambiente rural (Menezes, 2011). A alimentação dos povos se enquadra como um hábito cultural, sendo também representação da história local. No caso do queijo Minas artesanal, é inegável o valor de identificação cultural e sua simbologia em relação à identidade do mineiro (Netto, 2012; Severino, 2012).

3.1.2. Definição

A legislação brasileira determina queijo como um produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite, coagulado pela ação física do coalho, de enzimas e bactérias específicas, entre outros (Brasil, 1996). O queijo Minas artesanal, de produção restrita ao estado de Minas Gerais, é um produto feito a partir de leite cru e culturas lácticas naturais, maturado e produzido em queijaria localizada em propriedade rural (Minas Gerais, 2012).

Segundo a legislação vigente (Minas Gerais, 2011):

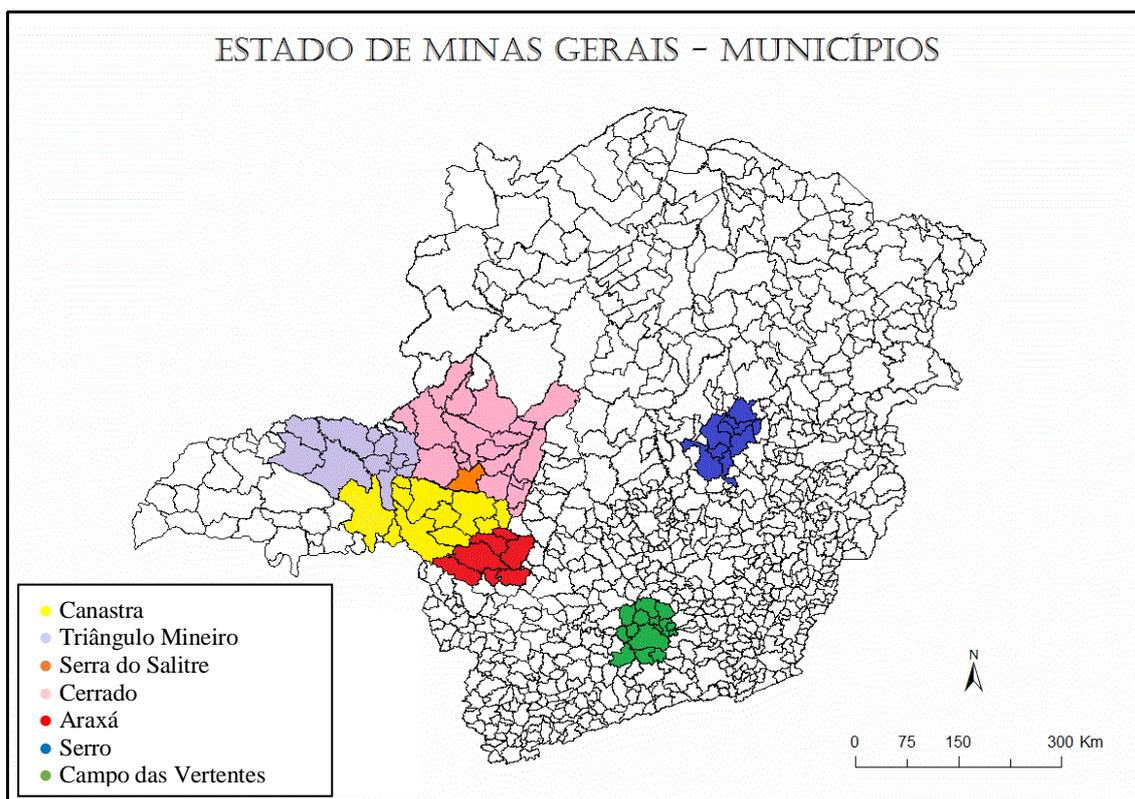
É considerado Queijo Minas Artesanal o queijo que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem.

São reconhecidas pela legislação estadual sete regiões produtoras de queijo Minas artesanal (figura 3.1). Todas as regiões foram definidas por portarias específicas, que enquadram os municípios participantes (Instituto Mineiro..., 2017a). Dentre as regiões oficiais, o Serro e a da Serra da Canastra apresentam indicação de procedência para os queijos produzidos em alguns de seus municípios (Instituto Nacional..., 2017).

O modo de fazer do queijo Minas artesanal também é um patrimônio imaterial brasileiro, tendo sido inscrito no Livro de Registro dos Saberes do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) em junho de 2008. Como parte do processo, foi criado um dossiê que descreve sua forma de produção (Meneses, 2006). Sua inclusão no Livro reforça a importância desse produto na história, na identidade e na economia do estado de Minas Gerais (Brasil, 2008).

3.1.3. Legislação

O queijo Minas artesanal é regido por legislações nacionais e estaduais. O principal documento de identidade e qualidade de queijos é a Portaria 146 de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esse documento fornece uma definição básica sobre queijos e suas classificações, além de determinar seus requisitos microbiológicos, e contempla a maturação de queijos feitos a partir de leite cru (Brasil, 1996). Apenas mais um texto, em toda a legislação federal consultada, discorre sobre queijos artesanais. A Instrução Normativa 30, de 2013, que também discorre sobre o período de maturação desses produtos (Brasil, 2013).



Fonte: adaptado de Empresa..., 2017; Mapas..., 2017

Figura 3.1. Mapa das regiões reconhecidas como produtoras de queijo Minas.

A legislação estadual tem como principal documento a Lei 20.549 de 2012, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Há também a Lei 19.492 de 2011, que alterou alguns itens da Lei 14.185 de 2002, já revogada (Minas Gerais, 2011). Elas são acompanhadas de diversas portarias, que dispõem sobre as normas de defesa sanitária para os rebanhos, de requisitos básicos das queijarias, de boas práticas de produção de queijo Minas artesanal e das microrregiões reconhecidas como produtoras de queijo. Também já foram editados dois decretos, que aprovam os regulamentos da Lei 14.185 de 2002 (Instituto Mineiro..., 2017a).

3.1.4. Âmbito social e econômico

Do ponto de vista econômico, deve-se considerar que a produção de queijo artesanal é uma alternativa viável contra a redução do número de pequenos produtores de leite, que permanecem no campo, ligados às suas origens. Em mercados especializados, um queijo artesanal de qualidade é altamente apreciado e pode atingir valor diferenciado (Meneses, 2006; Vasek *et al.*, 2008; Licitra, 2010). Em países em desenvolvimento, como no Brasil, a produção de queijos por meio da fermentação espontânea do leite cru também representa um método de preservação barato e confiável dessa matéria-prima (Beresford *et al.*, 2001).

Dentro do contexto econômico, Minas Gerais é reconhecidamente o mais tradicional elaborador de queijos no país. Em 2016, o estado apresentou o segundo maior rebanho bovino e foi o principal produtor de leite, com cerca de 23 milhões de cabeças e nove bilhões de litros de leite/ano. Em relação à agricultura familiar, em 2014 o estado contava com 437 mil estabelecimentos, que ocupavam uma área de cerca de nove milhões de hectares e empregavam 866 mil agricultores familiares (Minas Gerais, 2014; Minas Gerais, 2017a).

O queijo Minas artesanal, ainda que competindo com o queijo Minas industrializado, demonstra que tem força no âmbito econômico (Meneses, 2006). Estima-se uma produção anual de 29 mil toneladas (Amarante, 2015), passando por 70 mil toneladas (Cunha, 2011), até atingir 220 mil toneladas (Produção, 2017), de acordo com a fonte consultada.

A venda de queijos garante ao produtor uma renda mensal de cerca de oito mil reais (Recordistas, 2013). O produto fresco chega ao mercado em um valor próximo de R\$14 o quilo, enquanto o maturado, estocado por ao menos 20 dias, pode custar a partir de R\$50 (Ribeiro, 2016). Há uma preferência geral da população pelo produto fresco, que é consumido dessa maneira ou maturado na residência (Ornelas, 2005). Entretanto, a colocação do queijo maturado como um produto refinado tem atraído a atenção dos consumidores e do mercado, e tem propiciado o aparecimento de afinadores de queijo e lojas especializadas no produto (Girão, 2017).

No contexto social, o queijo Minas artesanal emprega de nove mil (Amarante, 2015) a 30 mil famílias (Fonseca, 2017). O universo de produtores enquadra tanto aqueles que vivem exclusivamente do queijo artesanal quanto aqueles que o elaboram apenas para consumo próprio. Ainda que com um perfil heterogêneo, pode-se considerar que a maioria dos produtores segue uma tradição histórica e familiar, em que o conhecimento do processo tem sido passado de geração a geração. A produção também se liga à terra onde a queijaria se encontra, tanto geográfica, o que contribui com a formação do *terroir* do produto, quanto afetivamente. Isso porque o queijo Minas artesanal permite a manutenção do produtor no seu local de origem, onde estão fixados seus laços de trabalho, de família e de pertencimento social. Como exemplo, é um costume comum a troca de soro-fermento, popularmente conhecido como pingo, entre os produtores de uma mesma região. Essa relação entre produtores também pode ser vista de uma forma ainda mais intensa na existência de associações e cooperativas exclusivas para o queijo Minas artesanal (O Mineiro, 2011).

Dentro do programa queijo Minas artesanal, desenvolvido pelo IMA e pela EMATER-MG, existem 276 produtores cadastrados e dois entrepostos relacionados no ano de 2017. Desses, sete queijarias e os dois entrepostos são registrados com o selo do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA), o que permite a comercialização do produto em todo o território nacional (Instituto Mineiro..., 2017b). Ainda assim, é um número muito abaixo daquele estimado para o total de queijarias no estado, entre nove e trinta mil (Amarante, 2015; Fonseca, 2017).

A ausência de controle sobre a produção daqueles produtores não cadastrados no programa queijo Minas artesanal também é preocupante. Isso porque a falta de educação sanitária e a não inspeção do produto final podem determinar um alimento que cause danos ao consumidor. A ilegalidade do queijo também diminui seu valor de mercado e o retorno financeiro social e econômico para seu produtor. Ainda que seja um produto forte em Minas Gerais, é inegável a ausência de dados concretos sobre a produção do queijo e sua situação atual. As fontes estudadas indicam informações desencontradas, o que dificulta a elaboração de medidas públicas e privadas para o fortalecimento da cadeia.

3.1.5. Características microbiológicas e físico-químicas

As características microbiológicas e físico-químicas de queijo Minas artesanal foram determinadas pelo Decreto 62.645 de 2002 (Minas Gerais, 2002). Nele, estão descritos os parâmetros legais microbiológicos e físico-químicos para inspeção do produto (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Parâmetros e padrões para inspeção de queijo Minas artesanal definidos pelo Decreto 62.645 de 2002

Parâmetro	Limite
Coliforme/g a 30°C	n=5, c=2, m = 1x10 ³ , M = 5x10 ³
Coliforme/g a 45°C	n=5, c=2, m = 1x10 ² , M = 5x10 ²
<i>Staphylococcus coagulase positivo</i> /g	n=5, c=2, m = 1x10 ² , M = 1x10 ³
<i>Salmonella spp.</i> /25g	Ausência
<i>Listeria spp.</i> /25g	Ausência
Umidade expressa em base úmida	< 45,9%;
Amido	Negativo
Fosfatase alcalina	Positiva

Diversos estudos já relataram as qualidades microbiológicas e físico-químicas de queijo Minas artesanal de algumas das sete regiões produtoras (tabela 3.2). Em comum, todos indicaram a inadequação dos queijos principalmente nos primeiros dias após a produção. Isso se deve tanto pela umidade estabelecida por lei ainda não ter sido atingida, como também pela microbiota indesejável, mais presente em queijos frescos (Castro *et al.*, 2016). Ademais, nenhum estudo reportou a pesquisa de *Mycobacterium bovis* nesses produtos.

Tabela 3.2. Estudos com caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal

Trabalho	Região	Tempo de maturação	Conformidade	Cadastro
Araújo, 2004	Araxá	8 dias	FQ: Não M: Não	N/A
Machado <i>et al.</i> , 2004	Serro	Fresco	FQ: Não M: N/A	N/A
Brant <i>et al.</i> , 2007	Serro	Fresco e maturado	FQ: Não M: Não	N/A
Pinto <i>et al.</i> , 2009	Serro	7 dias	FQ: N/A M: Não	N/A
Guimarães <i>et al.</i> , 2011	Canastra	8 dias	FQ: Sim M: N/A	N/A
Oliveira <i>et al.</i> , 2013	Serro, Canastra e Cerrado	Fresco	FQ: Não M: N/A	N/A
Oliveira, 2014	Campo das Vertentes	Ao longo da maturação	FQ: Sim M: Não	Sim
Sales, 2015	Araxá	Ao longo da maturação	FQ: Sim M: Sim	Sim
Castro <i>et al.</i> , 2016	Campo das Vertentes	Fresco	FQ: Não M: Não	Não

FQ: Físico-química; M: microbiológica
N/A: não se aplica

3.1.6. Maturação

Enquanto alguns queijos são saboreados frescos, a maioria dos produtos artesanais consumidos nos dias atuais é composta por queijos maturados a partir de duas semanas, por um período que pode durar até dois anos. Muitas variedades desse alimento podem ser consumidas em vários estágios durante esse período, dependendo das preferências do consumidor e de fatores econômicos. Durante a maturação, ocorre uma série complexa de mudanças bioquímicas, com a ajuda dos seguintes agentes: coagulante, enzimas do leite, como plasmina, bactérias iniciadoras e microbiota secundária (Fox *et al.*, 2004). A própria legislação nacional contempla o termo. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) determina que queijos maturados são aqueles que sofreram “trocas bioquímicas e físicas necessárias e características de suas variedades” (Brasil, 2017).

A maturação de queijos, portanto, é possível pela presença de um ecossistema complexo, formado por bactérias, bolores e leveduras. Estes micro-organismos desempenham interações antagonistas, mas também se cooperam enzimática e metabolicamente. Durante a maturação, são responsáveis por alterações no produto que, isoladamente, não conseguiriam alcançar (Arfi *et al.*, 2004). Além da microbiota indígena, fatores tecnológicos e ambientais também podem interferir com a microbiota de queijos durante a maturação (Hoorde *et al.*, 2010). A influência do período de maturação nas características físico-químicas em queijos mantidos em temperatura ambiente pode determinar a microbiota, com reduções nas contagens de coliformes e bactérias dos gêneros *Mycobacterium*, *Brucella*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Listeria* e outros micro-organismos indesejáveis (Dores *et al.*, 2013; Starikoff *et al.*, 2016).

A legislação brasileira determina que a maturação de queijos artesanais, feitos a partir de leite cru, deve ocorrer por no mínimo 60 dias, em temperatura acima de 5°C, até que eles possam ser consumidos (Brasil, 1996). Essa regulação brasileira tem como base a legislação americana que, desde 1949, determina esse período mínimo (Sung e Collins, 2000). Entretanto, a Instrução Normativa 30 de 2013, e o Decreto 9.013 de 2017 possibilitam que queijos feitos a partir de leite cru podem ser liberados para a venda e consumo com um período inferior a 60 dias de maturação. O período mínimo deverá ser obtido em estudos técnico-científicos que confirmem a qualidade e inocuidade desses produtos e sejam avaliados pelos órgãos de inspeção reconhecidos pelo SISBI/POA. Ainda assim, esses queijos devem vir de queijaria situada em região de indicação geográfica ou historicamente reconhecida como produtora de queijo artesanal e de rebanhos livres de ou controlados para tuberculose e brucelose (Brasil, 2013; Brasil, 2017). Se o período de maturação for superior a 60 dias, como a antiga legislação vigente determinava, o queijo Minas artesanal já não apresenta suas características de identidade, o que resulta em rejeição por parte do consumidor. Há também um grande comércio do produto ainda fresco, em descumprimento a esta regulamentação (Ornelas, 2005).

O período de maturação de queijo Minas artesanal está definido para aqueles produtos provenientes de queijaria integrantes do sistema SISBI-POA. De acordo com as Portarias estaduais 1.305 de 2013 e 1.736 de 2017, queijos da região de Araxá poderão ser comercializados a partir de 14 dias de maturação, da região do Serro a partir de 17 dias e das outras regiões, a partir de 22 dias (Minas Gerais, 2017b).

3.2. Bactérias ácido-láticas

3.2.1. Os micro-organismos

Bactérias ácido-láticas (BAL) são micro-organismos agrupados por compartilharem diversas similaridades. Elas são bactérias Gram positivo, não formadoras de esporos, em formato de bastonetes ou cocos e que produzem como ácido lático como o principal metabólito pós-fermentação de carboidratos. Os principais gêneros que constituem esse grupo são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Muitas BAL estão relacionadas à produção de alimentos fermentados, como queijos, iogurtes, salames e vegetais em conserva (Axelsson, 2004). Dentre as espécies mais comumente isoladas de produtos lácteos estão: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus johnsonii* (Jay *et al.*, 2005).

BAL são utilizadas em leite para, industrialmente ou artesanalmente, gerar seus derivados. Esses micro-organismos são responsáveis por produção de ácido, atividades proteolíticas, formação de aroma e formação de textura (produção de exopolissacarídeos). Todas essas atividades são capazes de caracterizar um produto lácteo fermentado, tornando-o mais rico em sabor e textura, com maior valor nutricional e com um tempo de prateleira prolongado (Mayra-Makinen e Bigret, 2004; Jay *et al.*, 2005).

BAL têm sido estudadas quanto a seu potencial probiótico. Muitas com a ação comprovada já estão disponíveis comercialmente. BAL também estão relacionadas à produção de bacteriocinas, peptídeos que apresentam atividade antagonista frente a diversos micro-organismos indesejáveis (Donaghy, 2010).

3.2.2. BAL isoladas de queijo Minas artesanal

Diversos trabalhos já relataram a microbiota láctica de queijo Minas artesanal (tabela 3.3). As BAL isoladas pertenciam principalmente aos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc*.

Também é grande o número de experimentos que demonstraram potencial probiótico desses micro-organismos (Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Silva, 2016; Acurcio *et al.*, 2017a; Acurcio *et al.*, 2017b; Sant'anna *et al.*, 2017). As espécies *W. paramesenteroides* e *L. rhamnosus* (Costa *et al.*, 2013), *L. plantarum* (Andrade *et al.*, 2014); *L. plantarum* e *L. rhamnosus* (Acurcio *et al.*, 2017a; Acurcio *et al.*, 2017b) e *P. acidilactici* e *L. plantarum* (Sant'anna *et al.*, 2017) demonstraram resultados positivos nos testes de resistência a ácidos gástricos e sais biliares, atividade antagonista contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. faecalis*, sensibilidade a antimicrobianos e, em alguns trabalhos (Acurcio *et al.*, 2017a; Acurcio *et al.*, 2017b; Sant'anna *et al.*, 2017), também antagonismo *in vivo*. Dentre essas BAL isoladas de queijo Minas artesanal, não há relatos, na literatura consultada, de testes contra *M. bovis* ou outras micobactérias.

Tabela 3.3. Espécies de BAL encontradas em queijo Minas artesanal

Trabalho	Região	Espécies
Lima <i>et al.</i> , 2009	Serra do Salitre	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus raffinosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Resende <i>et al.</i> , 2011	Canastra	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i>
Castro <i>et al.</i> , 2016	Campo das Vertentes	<i>Lactococcus garvieae</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. rhamnosus</i>
Luiz <i>et al.</i> , 2016	Araxá	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Enterococcus rivorum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i>
Sant'anna <i>et al.</i> , 2017	Campo das Vertentes	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i>

3.3. *Mycobacterium bovis*

3.3.1. O micro-organismo

Mycobacterium bovis é um micro-organismo causador da tuberculose bovina, em forma de bastonete, microaerofílico, álcool-ácido resistente, não redutor de nitrato, não produtor niacina e de crescimento fastidioso (Levison, 2008). Estima-se que um bacilo de *M. bovis* meça entre 3 a 5µm de comprimento e 0,2 a 0,6µm de largura e pese entre 5 e 10fg (Mishra *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009; Boyle *et al.*, 2014; Helmy *et al.*, 2015). Ainda que possa ser corado pela coloração de Gram e se apresentar levemente como Gram positivo, o teste morfotintorial de Ziehl-Neelsen é utilizado para corar *M. bovis* e outras micobactérias, o que as caracteriza como bastonetes álcool-ácido resistentes (Tortora *et al.*, 2012). O micro-organismo apresenta alta resistência a ambientes ácidos e alcalinos e a pirazinamida, além de ser capaz de sobreviver no ambiente, quando em condições ideais (Morris *et al.*, 1994; Rowe e Donaghy, 2008). Ainda que apresente relativa resistência a altas temperaturas, a pasteurização é uma eficiente forma de controle de *M. bovis* no leite (Forgrave *et al.*, 2016). Os binômios tempo-temperatura de pasteurização lenta e rápida apresentam igual eficácia na inativação do micro-organismo (Kells e Lear, 1960; Harrington e Karlson, 1965).

Mycobacterium bovis é integrante do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que também inclui os micro-organismos *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. africanum*. Dentro do grupo, *M. bovis* é aquele que apresenta uma maior diversidade de hospedeiros, atingindo tanto animais domesticados quanto selvagens, além de também afetar o homem (Brosch *et al.*, 2002). Assim, a tuberculose causada por *M. bovis* é considerada uma zoonose, com um padrão epidemiológico complexo, que inclui a transmissão dentro e entre animais de fazenda, animais silvestres e seres humanos (O'Reilly e Daborn, 1995).

O patógeno foi isolado inicialmente de lesões tuberculosas de bovinos. Robert Koch, o pesquisador responsável pelo descobrimento do bacilo, acreditou que o micro-organismo era inócuo para seres humanos. Entretanto, foi contrariado por Theobald Smith, cientista que atestou a virulência de *M. bovis* na infecção humana (Gallivan *et al.*, 2015).

3.3.2. Tuberculose bovina

A sintomatologia clássica da tuberculose bovina é uma doença respiratória progressiva, com formação de granulomas caseosos nos pulmões. Entretanto, o patógeno pode causar também granulomas característicos em outros órgãos e linfonodos, dependendo do local de entrada ou da fixação do bacilo (Rua-Domenech, 2006). A evolução da doença é, em sua maioria, crônica e alguns animais podem não demonstrar sinais clínicos evidentes, embora estejam transmitindo o patógeno (Organização..., 2009).

Quando a micobactéria adentra o corpo, ela chega ao órgão inicial (como exemplos: pulmão, linfonodos cervicais ou intestinos) e é englobada por macrófagos, que a transportam através do epitélio, até atingir camadas mais internas. Novos macrófagos são então recrutados e formam um granuloma, que é constituído por várias células de defesa. O patógeno continua se replicando dentro dos macrófagos, até que o granuloma restrinja o crescimento microbiano. Entretanto, esse mesmo granuloma pode sofrer necrose, o que possibilita a manutenção do micro-organismo e o desenvolvimento da doença e de sinais clínicos, que estão relacionados ao local da lesão (Tortora *et al.*, 2012; Cambier *et al.*, 2014). A evolução da doença é normalmente crônica, podendo perdurar por anos. O micro-organismo também pode se deslocar de uma lesão primária da doença e, via corrente sanguínea, atingir outro local, denominado foco secundário. Pode ocorrer ainda uma dormência inicial do patógeno, que se mantém dessa forma até sofrer uma reativação, que pode ocorrer décadas após a infecção e atuar tanto no local de entrada, quanto em um local secundário. Assim, a literatura reporta lesões tuberculosas em praticamente todos os órgãos (Stout *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2006; Böhme *et al.*, 2007; Cachafeiro-Vilar *et al.*, 2007; Rowe e Donaghy, 2008; Milián-Suazo *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2015).

Os sinais clínicos, quando presentes, estão associados ao local principal de infecção. No caso de bovinos acometidos pela tuberculose respiratória, a forma mais prevalente, pode-se identificar tosse, linfonodos aumentados de volume e dificuldade na respiração. Sinais inespecíficos também estão presentes, como perda de peso, anorexia, apatia e febre. Além disso, a ausência de sinais clínicos é possível mesmo em casos avançados da doença (Grange e Yates, 1994; Organização..., 2009).

Os fatores de risco sobre a tuberculose bovina podem ser estratificados em três níveis distintos: animais (individual), rebanho e região (tabela 3.4).

Os impactos da doença podem ser vistos na perda de produção animal, que pode chegar a 10% da produção leiteira, na condenação desses animais, na desvalorização das propriedades e, principalmente, na perda humana pela tuberculose zoonótica. Além disso, o custo da implantação de programas para eliminação da doença em um país é altíssimo, o que dificulta o controle em países em desenvolvimento (Zinsstag *et al.*, 2009; Olea-Popelka *et al.*, 2017).

Tabela 3.4. Fatores de risco de tuberculose em bovinos

Estrato	Fator de risco	Causa
Animal	sexo	Machos permanecem mais tempo nos rebanhos mais infectados (reprodutores); tempo prolongado de contato com diversos animais
	raça, genética	Raças europeias e criadas em sistema intensivo são mais susceptíveis
	idade	Animais mais velhos têm contato prolongado com diversos animais; reativação de infecção
	status imunológico	Imunodepressão é fator predisponente para doença
	estado nutricional	Causa e/ou consequência da doença
	uso de colostro e leite	Se em rebanho positivo; transmissão pelo colostro/leite ou pelo contato com a mãe
	Manejo, exploração	Em gado leiteiro, pela atividade intensiva
Rebanho	Histórico de bTB	Manutenção dos mesmos animais por anos
	Tamanho	Quanto maior o rebanho, maior o risco por contato entre animais intra e extra-rebanho, circulação maior de compra e venda, intensificação
	Contato animais e seres humanos	Manutenção do ciclo tuberculose zoonótica entre as espécies
	Serviços veterinários	Quanto menos serviços, maior o risco: baixa aplicação de testes diagnósticos, menor acompanhamento veterinário
	Compras	Entrada de animais contaminados no rebanho
	Movimentos	Contato com rebanhos infectados
	Contato com outras espécies	Contato com animais selvagens ou domésticos infectados
Regional	Prevalência mundial, nacional e local	Rebanhos em países ou regiões endêmicas apresentam maior risco
	Compras internacionais	Introdução de animais contaminados/espilgotipos exóticos
	Imigração – globalização	Introdução de seres humanos ou animais contaminados de áreas endêmicas; introdução de espilgotipos exóticos

Fontes: Harris *et al.*, 2007; Humblet *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2014; Barbieri *et al.*, 2016

3.3.3. Prevalência da doença em animais

A tuberculose por *M. bovis* está presente em todos os continentes e o acometimento é maior em países em desenvolvimento, pois eles dispõem de menores recursos para a implantação e manutenção de programas de controle e erradicação (Humblet *et al.*, 2009, Organização..., 2016).

No Brasil, a tuberculose bovina é endêmica e está distribuída de forma heterogênea por todo o território nacional. A prevalência da doença em bovinos varia de acordo com a localidade e o rebanho explorado e atinge valores de até 13,9%. Segundo estudo recente, a doença acomete com maior intensidade rebanhos leiteiros de alta produção e com algum grau de tecnificação. Isso ocorre uma vez que essa forma de exploração envolve uma concentração maior de animais por área, principalmente durante a ordenha. Outro problema também enfrentado é a introdução de animais já doentes ao rebanho, sem que tenham sido testados previamente para tuberculose (Ferreira Neto *et al.*, 2016).

Tabela 3.5. Prevalência de tuberculose bovina em rebanhos em Minas Gerais nos anos de 1999 e 2013 em função das regiões produtoras de queijo Minas artesanal (QMA)

Mesorregião	Região produtora de QMA	Prevalência em 1999 (%)	Prevalência em 2013 (%)
Noroeste, Norte e Nordeste	Cerrado	-	1,15
Leste	Serro	2,17	1,65
Central	Campo das Vertentes e Serro	3,36	6,64
Zona da Mata	-	5,12	4,8
Sul e Sudoeste	-	7,17	6,77
Alto Paranaíba	Araxá, Canastra e Serra do Salitre	9,66	4,24
Triângulo Mineiro	Triângulo, Cerrado e Serra do Salitre	2,08	4,45
Oeste	Canastra	4,12	-

Fontes: Belchior, 2016; Barbieri *et al.*, 2016, Instituto Mineiro..., 2017a

É interessante também comparar os riscos apresentados por ambos os trabalhos com as características atuais de produção de queijo Minas artesanal. É óbvia a associação entre produção leiteira e produção de queijo Minas artesanal. Entretanto, a maioria dos rebanhos envolvidos nas fazendas cujo queijo é o foco da produção é formada por até 20 animais e a produção é semiextensiva, fatores não caracterizados como de risco (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Belchior, 2016; Barbieri *et al.*, 2016). No caso de propriedades cadastradas, pode-se ainda argumentar que é obrigatório o acompanhamento veterinário, assim como a aplicação anual de teste diagnóstico, que deve ser negativo, para detecção de tuberculose bovina (Minas Gerais, 2002). Ainda assim, causa preocupação que todas as regiões identificadas como produtoras de queijo Minas artesanal são endêmicas para a doença.

3.3.4. Legislação

Reconhecendo que a tuberculose bovina é endêmica no rebanho, órgãos federais e estaduais criaram leis e programas que visam reduzir a incidência e a prevalência da doença. Tais ações têm como objetivos o aumento da produtividade pecuária, a proteção sanitária do rebanho e dos consumidores de produtos de origem animal.

No país, o MAPA instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), em 2001, com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência dessas enfermidades (Brasil, 2001; Ministério da Agricultura..., 2006). Em seu manual, os pontos principais do programa são a certificação voluntária para propriedades livres ou monitoradas, a padronização de procedimentos de diagnóstico e o abate obrigatório de animais positivos (Poester *et al.*, 2002; Ministério da Agricultura..., 2006). Entretanto, após 15 anos da introdução do PNCEBT, a situação epidemiológica da doença se manteve muito semelhante pelo país. Embora em grande parte do Brasil, onde existe uma exploração bovina para carne, a prevalência tenha se mantido baixa, em estados importantes na produção pecuária leiteira, essas mesmas taxas

aumentaram quando comparadas com as de 2004. Também nesse período apenas 1100 fazendas estavam certificadas como livre da tuberculose (Ferreira Neto *et al.*, 2016).

De acordo com o RIISPOA, em seu artigo 243, é proibida a utilização de leite de animais que “apresentem diagnóstico clínico ou resultado de provas diagnósticas que indiquem a presença de doenças infectocontagiosas que possam ser transmitidas ao ser humano pelo leite” (Brasil, 2017). Também no nível federal, os queijos produzidos a partir de leite cru devem ser provenientes de propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose ou controladas para brucelose e tuberculose pelo IMA, no caso do queijo Minas artesanal (Brasil, 2013).

A legislação de Minas Gerais, ao estabelecer normas de defesa sanitária para os rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal, vai ao encontro do PNCETB e do RIISPOA (Minas Gerais, 2012). O produtor cadastrado pelo IMA no Programa queijo Minas artesanal deve garantir que seu rebanho seja livre para tuberculose. Se animais forem considerados positivos, devem ser imediatamente isolados e afastados da produção leiteira, até que sejam abatidos em no máximo 30 dias. O mesmo texto determina que os trabalhadores envolvidos no manejo do gado e na produção dos queijos também sejam testados anualmente para a doença (Minas Gerais, 2002).

3.3.5. *Mycobacterium bovis* em leite e derivados lácteos

A principal forma de contaminação do leite por *M. bovis* é pela infecção do úbere, quando há eliminação desses micro-organismos. A excreção pode ocorrer tanto pela passagem direta do patógeno da corrente sanguínea para o leite, em uma infecção sistêmica, ou pela descarga direta do bacilo, no caso de mastite tuberculosa (Claeys *et al.*, 2013). Estudos relatam valores excretados entre 5×10^2 a 5×10^5 UFC/mL de *M. bovis* no leite (Kells e Lear, 1960; Zanini *et al.*, 1998). Outras formas menos usuais são contágio por respingos de fezes e urina, além de partículas de ar (Pritchard, 1988), contaminação pós-pasteurização ou pela presença do patógenos em equipamentos mal sanitizados (Abrahão *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi relatada presença de *M. bovis* em colostro, aumentando a probabilidade de contágio entre animais e a persistência da doença em rebanhos (Serrano-Moreno *et al.*, 2008).

No Brasil, bactérias do gênero *Mycobacterium*, inclusive *M. bovis*, foram identificadas em leite de vacas e de búfalas no Brasil (tabela 3.6).

Todos esses trabalhos confirmam que a população brasileira se encontra exposta a *M. bovis* pelo consumo de leite. Os dados também trazem preocupação, visto que existe um costume de consumo de leite cru ou não inspecionado no país (Leite *et al.*, 2003; Bolaños *et al.*, 2017).

Como *Mycobacterium bovis* é considerado um micro-organismo contaminante do leite, assim, pode ser encontrado em queijos artesanais, em sua maioria, feito com leite cru. A presença desse patógeno na principal matéria prima pode ocasionar a contaminação do produto final e, conseqüentemente, sua ingestão por consumidores. Portanto, em áreas endêmicas, derivados lácteos feitos a partir de leite cru podem estar contaminados por *M. bovis* e, então, necessitam de atenção particular no monitoramento e vigilância (Clark Jr. *et al.*, 2006). Em estudo no México, de 95 amostras de queijo fresco, seis foram positivas para o patógeno (Pereira-Suárez *et al.*, 2014). *M. bovis* também já foi isolado de queijo tipo Panela nos EUA (Kinde *et al.*, 2006), queijo Fresco nos EUA (Center..., 2005; Harris *et al.*, 2007) e queijo artesanal alemão (Kaevska e Hruska, 2010).

Tabela 3.6. Trabalhos que relatam a identificação de *Mycobacterium* spp. em leite no Brasil

	Estado	Espécie de <i>Mycobacterium</i>	Forma de detecção	Tipo de leite	Status rebanho
Pardo et al., 2001	SP	<i>M. bovis</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i>	Cultura e PCR-RFLP	Cru e pasteurizado	?
Leite et al., 2003	PB	<i>M. bovis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.	Cultura e Multiplex PCR	Cru	+
Jordão Junior et al., 2009	SP	<i>M. simiae</i> ; <i>M. kansasii</i> , <i>M. flavescens</i> ; <i>M. gordonae</i> ; <i>M. lentiflavum</i>	Cultura e PCR (PRA)	Cru	+
Jorge, 2011	MS	<i>M. bovis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp.	Cultura e PCR	Cru	+
Franco et al., 2013	SP	<i>M. bovis</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. duvalii</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. immunogenum</i> , <i>M. lentiflavum</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. novocastrense</i> , <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. terrae</i> ; <i>M. vaccae</i>	Cultura e PCR	Cru	?
Zarden et al., 2013	RJ	<i>M. bovis</i>	Cultura e m-PCR	Cru	+
Sgarioni et al., 2014	PR	<i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. kansasii</i> ; <i>M. scrofulaceum</i>	Cultura e PCR (PRA)	Cru e pasteurizado	?

No Brasil, *M. bovis* já foi isolado de queijo coalho (Rocha, 2013; Silva *et al.*, 2013a). Outro estudo identificou bactérias do gênero *Mycobacterium* a partir de queijos Minas meia cura (Moriconi, 2013). Em todos esses estudos foram feitos isolamentos tanto de colônias quanto de identificação molecular.

DNA de *M. bovis* também foi identificado no Brasil em leite em pó, em doce de leite e em queijos importados, trazidos por turistas. Todos os produtos foram confiscados em aeroportos internacionais e, se permitidos, teriam possibilitado a entrada de outros espógotipos do micro-organismo no território nacional (Melo *et al.*, 2014).

Mycobacterium bovis BCG é um micro-organismo atenuado usado para vacinação de seres humanos em alguns países. É considerado da mesma espécie de *Mycobacterium bovis*, o patógeno responsável pela tuberculose bovina (Moliva *et al.*, 2015). Ambos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e apresentam uma similaridade genética de 99,9% (Brosch *et al.*, 2002).

A principal diferença entre *M. bovis* BCG e os outros componentes do MTC, entretanto, é a ausência de uma sequência genômica denominada RD1, que seria responsável por sua atenuação (Mahairas *et al.*, 1996). Essa região é composta por onze genes e responde pela expressão de dez proteínas ligadas à virulência dos patógenos *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Acredita-se que a RD1 está associada a um sistema de secreção dos antígenos ESAT-6 e CFP-10, responsáveis pela lise de células de defesa e pela invasão de tecidos do hospedeiro (Hsu *et al.*, 2003, Jordao *et al.*, 2008).

A presença de *M. bovis* BCG em leite e seus derivados, como queijos artesanais, é virtualmente impossível. Isso porque, no Brasil, o uso de *M. bovis* BCG como vacina bovina é proibido (Ministério da Agricultura..., 2006). Ainda que permitido, animais vacinados experimentalmente com *M. bovis* BCG não o eliminam pelo leite (Val *et al.*, 2016). Entretanto, esse micro-organismo tem sido usado como uma alternativa a *M. bovis* em estudos científicos diversos (Meyers *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2000; Rao *et al.* 2001; Sweeney *et al.*, 2006; Nde *et al.*, 2011), incluindo aqueles em produtos lácteos (Macuamule *et al.* 2016). Isso porque sua manipulação é considerada mais segura e, associada a sua similaridade com os outros componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG prediz o comportamento de *M. bovis* tanto *in vitro* quanto *in situ* (Mariam, 2009; Macuamule *et al.*, 2016).

3.3.6. Tuberculose zoonótica

Desde que *Homo sapiens* iniciou a domesticação de animais, as zoonoses se tornaram constantes na vida humana. *Mycobacterium bovis* é considerado um dos mais antigos patógenos “compartilhados” entre gado e o homem (van Helden *et al.*, 2013), tendo sido isolado de múmias humanas da idade do ferro do sul da Sibéria (1200 A.C.) (Murphy *et al.*, 2009).

Ainda em 1888, o pesquisador escocês Walley considerou que tuberculose bovina poderia ser transmitida a humanos pelo consumo de leite e de seus derivados; além disso, recomendou que médicos veterinários fossem responsáveis pela inspeção de produtos de origem animal para evitar impactos da doença na saúde pública (Pritchard, 1988). Em 1898, Theobald Smith sugeriu que o bacilo causador da doença em humanos era diferente daquele causador de tuberculose em bovinos (Bezoz *et al.*, 2014). McFadyean, em 1901, reconheceu que animais clinicamente saudáveis eram capazes de excretar o micro-organismo no leite e reforçou a opinião de Walley quanto ao risco de consumo de produtos lácteos para desenvolvimento da doença (McFadyean, 1901).

Mesmo que espécies distintas causem tuberculose com maior frequência em seus hospedeiros finais (*M. tuberculosis* em seres humanos e *M. bovis* em bovinos), esses micro-organismos são capazes de intercalar a espécie-alvo (van Helden *et al.*, 2013). Por exemplo, *M. bovis* é encontrado com maior frequência em bovinos. Entretanto, suas características genéticas permitem que contaminem um grande número de mamíferos, incluindo seres humanos (Brosch *et al.*, 2002). A sintomatologia clínica independe da espécie causadora da doença, sendo bastante semelhante se causada por *M. bovis* ou *M. tuberculosis*. A diferença ocorre apenas na localização do patógeno, que se desenvolveu após a inalação ou ingestão do bacilo (Organização..., 2009).

O desenvolvimento da doença ocorre de maneira semelhante àquela descrita no 4.1.3.2. Se a bactéria é ingerida, o que ocorre com maior frequência com *M. bovis*, a infecção inicial ocorre principalmente nos linfonodos cervicais e então nos intestinos e em seus linfonodos. Assim, a sintomatologia clássica para tuberculose zoonótica é a escrófula, a linfadenite cervical e o granuloma com necrose caseosa na região ileocecal e nos linfonodos mesentéricos. As lesões secundárias mais atribuídas a *M. bovis* são meningite bacteriana, artrite poliarticular e a própria

tuberculose pulmonar (Grange, 2001; Shah *et al.*, 2006; Böhme *et al.*, 2007; Cachafeiro-Vilar *et al.*, 2007; Rowe e Donaghy, 2008; Milián-Suazo *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2015).

Mesmo após um século de seu descobrimento, a doença causada por *Mycobacterium bovis* é uma zoonose ainda com sérias implicações para a saúde humana (Olea-Popelka *et al.*, 2017). As principais formas de transmissão são por exposição ocupacional ao patógeno e por consumo de leite contaminado e seus derivados (Dankner e Davis, 2000). Diversos estudos continuam a associar a tuberculose zoonótica à tuberculose extrapulmonar. Isso confirma que, ainda atualmente, a principal causa da doença é a ingestão de leite e derivados contaminados (Dürr *et al.*, 2013; Pérez-Lago *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2016).

A dose infectante de *M. bovis* em humanos é desconhecida (Walsh e Morgan, 2014), embora sugere-se que esteja em torno de 10^6 UFC (Advisory..., 2017). Em animais experimentais, ela varia de acordo com a via de entrada do bacilo. Cinco ou menos micro-organismos por via aérea são capazes de provocar sinais clínicos, enquanto que, por via oral, contagens entre 10^4 UFC e 10^8 UFC foram capazes de infectar animais experimentais (Goodchild e Clifton-Hadley, 2001; Palmer *et al.*, 2002).

3.3.7. Prevalência da doença em humanos

Estima-se que a tuberculose cause a morte de dois milhões de pessoas por ano, sendo a doença infecciosa que mais mata no mundo (Organização..., 2017). Ainda que a maioria seja pela contaminação por *M. tuberculosis*, não há informação disponível e confiável sobre a incidência e a prevalência de *M. bovis* em seres humanos e o número de mortes relacionadas a esse patógeno (Gibson *et al.*, 2004; Thoen e Lobue, 2007; Jorge, 2011; Laniado-Laborín *et al.*, 2014; Organização..., 2017). Conseqüentemente, o impacto epidemiológico da infecção humana por esse patógeno zoonótico ainda não foi mensurado e é uma lacuna importante, principalmente em países em desenvolvimento. Isso porque, sem dados disponíveis, a implantação de medidas de controle específicas e de monitoramento torna-se complexa e ineficaz (Fujiwara e Olea-Popelka, 2016; Ramos *et al.*, 2016).

Alguns estudiosos consideram que a infecção humana por *M. bovis* tem caído consideravelmente em países com programas de erradicação totalmente implantados e com tradição na industrialização de lácteos, como a pasteurização de leite. Assim, acredita-se que o risco zoonótico desse patógeno seja pouco substancial (Biet *et al.*, 2005; Doran *et al.*, 2009). Outros estudos, entretanto, já consideram tuberculose em humanos devida a *M. bovis* uma doença infecciosa emergente em países desenvolvidos e endêmica em países em desenvolvimento (Welburn *et al.* 2015; El-Sayed *et al.* 2016; Olea-Popelka *et al.*, 2017). Isso ocorre porque os programas de erradicação não estão sendo suficientes para eliminar os focos bovinos (Brooks-Pollock *et al.*, 2014), diversos animais silvestres têm mantido o micro-organismo no ambiente (Thoen *et al.*, 2006) e porque a epidemia de AIDS contribui para a perpetuação do patógeno em seres humanos (Prasad *et al.*, 2005; Olea-Popelka *et al.*, 2017).

A tuberculose zoonótica é muitas vezes diagnosticada como tuberculose por *M. tuberculosis* (Pérez-Lago *et al.*, 2014). Isso porque as informações precisas quanto à ocorrência de tuberculose humana por *M. bovis* não estão disponíveis por: (i) o uso de microscopia direta em espécimes clínicos, que não diferencia as espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*; (ii) o crescimento inadequado de *M. bovis* em meio Lowenstein-Jensen, o meio de cultura utilizado rotineiramente para diagnóstico; (iii) a baixa quantidade de bacilos em amostras extrapulmonares;

(iv) o aspecto zoonótico de *M. bovis*, pouco investigado na medicina humana e pelos órgãos governamentais de saúde (Prasad *et al.*, 2005; Rowe e Donaghy, 2008). Assim, não há dados suficientes para demonstrar as consequências globais de tuberculose humana por *M. bovis* (Müller *et al.*, 2013).

Mesmo sem dados concretos, estima-se que *M. bovis* seja responsável por até 250.000 novos casos de tuberculose humana no mundo, causando até 23 mil mortes anuais (Organização..., 2017). Em comparação à incidência mundial de tuberculose humana, de 164 novos casos por 100 mil habitantes, a tuberculose zoonótica pode corresponder a 2% desse total. A prevalência varia de acordo com o país e seu grau de desenvolvimento, a endemia da doença em animais, os hábitos alimentares da população e se há um programa de erradicação da tuberculose bovina (Gibson *et al.*, 2004; Laniado-Laborín *et al.*, 2014). Países desenvolvidos e industrializados apresentam programas de erradicação bem estruturados e aplicados, que contribuem para baixas taxas de incidência e prevalência da doença tanto em humanos quanto em animais (Mignard *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2010). Em países em desenvolvimento, ainda que poucos estudos indiquem um valor preciso, a prevalência de tuberculose humana por *M. bovis* encontra-se em patamares superiores. Isso ocorre porque há uma incidência maior da doença em animais, a pasteurização do leite não é regularmente aplicada, as populações humanas muitas vezes se encontram em situação de risco, como pobreza, nutrição inadequada e uma taxa de infecção maior para HIV (Michel *et al.*, 2010; Olea-Popelka *et al.*, 2017).

No Brasil, dois trabalhos de 2011 apontaram resultados idênticos na identificação de *M. bovis* em espécimes clínicos humanos. No primeiro, amostras de 99 indivíduos com tuberculose foram testadas e apresentaram resultado negativo para a presença do patógeno zoonótico (Silva *et al.*, 2011). No segundo, amostras de 3046 pacientes suspeitos de tuberculose foram testadas e, novamente, nenhuma se mostrou positiva para *M. bovis* (Rocha *et al.*, 2011). Em outro estudo no país, em 189 pacientes previamente diagnosticados com tuberculose, determinou-se que 1,6% estavam contaminados por *M. bovis* (Silva *et al.*, 2013b). Pode-se questionar os resultados dos trabalhos, que concluíram que a importância do patógeno no país é desprezível frente ao quadro global de tuberculose por *M. bovis*. Os autores limitaram o estudo a uma população específica, urbana e já com suspeita da doença. Entretanto, ignoraram os principais fatores de risco relacionados à doença e que são encontrados com maior frequência no meio rural (Rocha *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013b). Apenas um estudo encontrado na literatura nacional recente reporta a tuberculose em ambiente rural. Em uma pesquisa para determinar a prevalência de tuberculose bovina do rebanho mineiro, foi reportado que, em 2% das propriedades estudadas, havia ao menos um caso de tuberculose em humanos. Não houve, entretanto, pesquisa para determinar a espécie do patógeno (Belchior *et al.*; 2016). Assim, ainda é desconhecida a situação atual da tuberculose humana causada por *M. bovis* no país.

3.3.8. Fatores de risco para tuberculose zoonótica

Os principais fatores de risco de tuberculose humana por *M. bovis* são associados a histórico de consumo de leite e derivados sem tratamento térmico, situação de imigrante/minorias étnicas, imunossupressão ou co-infecção com HIV, contato com animais, risco ocupacional, *status* socioeconômico e faixa etária, principalmente criança ou idosos (Gibson *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006; Cachafeiro-Vilar *et al.*, 2007).

Ainda que a pasteurização compulsória do leite e a migração da população rural para as cidades fizeram com que a forma gastrointestinal da doença tenha sido menos diagnosticada, os trabalhos

pesquisados indicam que o consumo de leite e derivados sem tratamento térmico ainda é o principal fator de risco da doença em humanos (Center..., 2005; Rowe e Donaghy, 2008; Ameni *et al.*, 2013; Forgrave *et al.*, 2016). Em países em desenvolvimento, o leite pode vir diretamente da propriedade onde é produzido, sem ter sido submetido à pasteurização (Cook *et al.*, 1996). Tal fato pode ocorrer mesmo em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a legislação obriga a pasteurização do leite e o parque industrial é capaz de tratá-lo, como no Brasil (Abrahão *et al.*, 2005). Quando associadas ao fato de a tuberculose ser endêmica em bovinos, essas situações favorecem o aparecimento da doença em consumidores de leite. Em estudos ingleses, o consumo de produtos lácteos foi considerado o principal fator de risco associado à infecção por *M. bovis* (Jalava *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2011; Ramdas *et al.*, 2015). Outros estudos também apontaram o consumo de leite e derivados sem tratamento térmico como fator de risco significativo para a tuberculose humana por *M. bovis*. Esses trabalhos foram desenvolvidos em países com situações epidemiológicas, sociais e econômicas bem distintas, como nos EUA (Dankner *et al.*, 1993; Stout *et al.*, 2001; Center..., 2005; Park *et al.*, 2010); em Zâmbia (Cook *et al.*, 1996), na Nova Zelândia (Baker *et al.*, 2006), na Argentina (Córdova *et al.*, 2012), no Brasil (Silva *et al.*, 2013b) e no México (Torres-Gonzalez *et al.*, 2013). A grande quantidade de trabalhos indica, portanto, a representatividade desse fator de risco na tuberculose humana por *M. bovis*.

A imunossupressão é fator importante para o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive tuberculose humana por *M. bovis*. Isso ocorre uma vez que as defesas imunes se encontram enfraquecidas e são incapazes de reagir com eficiência frente a patógenos invasivos (Neill *et al.*, 2005). A epidemia de AIDS também é responsável pelo aumento de casos de tuberculose humana por *M. bovis*. Ainda que a situação seja mais crítica em países africanos, onde a epidemia chega a atingir 50% da população jovem adulta, países desenvolvidos também apresentam taxas consideráveis de co-infecção entre HIV e *M. bovis* (Cosivi *et al.*, 1998; Esteban *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010). Diversos trabalhos já confirmaram uma relação direta e significativa entre infecções por *M. bovis* e HIV: na Espanha (Roig *et al.*, 1999; Esteban *et al.*, 2005), na Tanzânia (Cleaveland *et al.*, 2007), no México (Cicero *et al.*, 2008) e nos EUA (Rodwell *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010).

Segundo alguns autores, a re-emergência de tuberculose humana por *M. bovis* em países desenvolvidos se deve à intensa imigração de pessoas oriundas de regiões onde a tuberculose bovina ainda é endêmica (Holsinger *et al.*, 1997; Cousins e Dawson, 1999; Thoen *et al.*, 2006; Rodwell *et al.*, 2008). Estudos diversos têm provado que, na Europa, habitantes vindos de países em desenvolvimento (Böhme *et al.*, 2007; Majoor *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2011) são portadores do patógeno e podem, além de desenvolver a doença, contaminar outros habitantes. Nos EUA, a incidência e a prevalência da doença são expressivamente maiores em imigrantes vindos do México (Dankner *et al.*, 1993; Besser *et al.*, 2001; Stout *et al.*, 2001; Center..., 2005; Winthrop *et al.*, 2008; Cicero, 2008; Gallivan *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015). É interessante salientar também que essas populações podem apresentar hábitos culturais de consumo de leite cru e, principalmente, muitas vezes encontram-se em situação socioeconômica inferior, o que aumenta o risco de infecção por *M. bovis* (Cicero *et al.*, 2008; Rodwell *et al.*, 2008).

O contato com animais domésticos também, tanto ocupacional quanto esporádica, é considerado como fator de risco para a tuberculose por *M. bovis* (Regassa *et al.*, 2008; Rowe e Donaghy, 2008). A exposição principal ocorre por via aérea, o que determina um quadro clínico com acometimento dos pulmões e seus linfonodos (Amanfu, 2006; Michel *et al.*, 2010). Dever-se notar que trabalhadores rurais também apresentam maior probabilidade de consumir leite cru direto do animal ou do tanque de expansão. Assim, há uma confluência entre esses dois fatores, aumentando

o risco de desenvolvimento da doença (Jalava *et al.*, 2006). Vários trabalhos têm relacionado a profissão ou o contato com animais com o aumento das chances de se infectar com *M. bovis*: na Espanha (Sauret *et al.*, 1992), em Zâmbia (Cook *et al.*, 1996), na Austrália (Cousins e Dawson, 1999); na Inglaterra (Smith *et al.*, 2004), na Argentina (Etchechoury *et al.*, 2010; Córdova *et al.*, 2012), na Nigéria (Adesokan *et al.*, 2012) e no México (Torres-Gonzalez *et al.*, 2013).

O *status* socioeconômico está relacionado tanto ao estado físico do ser humano, capaz de responder às infecções, quanto às condições sanitárias em que ele vive. Assim, tuberculose está muitas vezes associada a populações carentes, que vivem em ambientes rurais, com pouco acesso à educação e a um sistema de saúde eficiente (Grange, 2001; Shah *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2010; Boukary *et al.*, 2012). É comum a sobrevivência dessas comunidades se basear em uma pecuária de subsistência, com animais pouco produtivos e, muitas vezes, contaminados por *M. bovis* ou outros patógenos (Cleaveland *et al.*, 2007). Assim, o leite derivado desse rebanho pode estar contaminado e, como fonte principal de proteína, pode ser responsável pela disseminação do patógeno para a população (Cosivi *et al.*, 1998; Cleaveland *et al.*, 2007).

Historicamente, crianças eram o principal grupo etário acometido por tuberculose bovina causada por *M. bovis*. Isso porque leite e derivados eram (e ainda são) um dos principais grupos alimentícios para crianças e, até início do século XXI, eram distribuídos sem o tratamento térmico adequado. Assim, o consumo de produtos lácteos crus infectados por *M. bovis* e a incompetência do sistema imune própria da idade resultavam em uma epidemia em crianças em diversos países (Dollab, 1901; Dankner *et al.*, 1993). Já no século XXI, leite e seus derivados são considerados alimentos próprios para essa faixa etária, desde que tratados termicamente. Mesmo que a situação atual seja menos crítica (Etchechoury *et al.*, 2010), diversos trabalhos continuam a apontar a infância como fator de risco para o desenvolvimento da doença (Dankner *et al.*, 1993). Principalmente em países em desenvolvimento, crianças são infectadas por *M. bovis* em maiores proporções que a população adulta em geral (Biet *et al.*, 2005). Populações de crianças imigrantes em países desenvolvidos também apresentam o mesmo fator de risco e pelas mesmas causas (Dankner *et al.*, 1993; Center..., 2005; Rodwell *et al.*, 2008).

Em idosos, sugere-se que tuberculose por *M. bovis* seja causada pela imunossupressão inerente à idade aliada à reativação do micro-organismo (Majoor *et al.*, 2011). Isso ocorre uma vez que o patógeno, ao ser ingerido ou inalado, é mantido em um estado viável, mas não replicador (Jalava *et al.*, 2007; Rowe e Donaghy, 2008). Até o desenvolvimento da doença, os indivíduos acometidos não apresentam sinais clínicos ou transmitem a doença, mas podem ser positivos no teste de Mantoux. É importante salientar, entretanto, que os indivíduos idosos podem, após o desenvolvimento da doença, se tornar focos de infecção para pessoas saudáveis (Cassidy, 2006). É vasta a literatura que relaciona a terceira idade como fator de risco, principalmente quando associada ao consumo de leite e derivados na infância: na Irlanda (Cotter *et al.*, 1996), na Austrália (Cousins e Dawson, 1999), na Inglaterra (Gibson *et al.*, 2004; Torgerson e Torgerson, 2010; Mandal *et al.*, 2011) e na França (Mignard *et al.*, 2006).

3.3.9. Interação *M. bovis* x BAL x produtos lácteos

Em produtos de origem animal, a sobrevivência de *M. bovis* depende de características intrínsecas e extrínsecas desses alimentos. Isso, porque durante a evolução, plantas e animais que hoje servem de alimento ao homem desenvolveram mecanismos de defesa contra a invasão e proliferação de micro-organismos indesejáveis. Alguns desses dispositivos mantêm-se ativos mesmo quando esses seres vivos são transformados em alimentos. Assim, ao levar em consideração esses

fenômenos naturais, pode-se prevenir ou retardar o crescimento de micro-organismos patógenos ou deterioradores (Jay *et al.*, 2005).

Mycobacterium bovis, durante sua evolução, foi capaz de desenvolver mecanismos para sobrevivência em situações adversas. Uma característica interessante do gênero *Mycobacterium* é a capacidade de transformação do bacilo em um morfotipo semelhante a um esporo. Ainda que as transformações não sejam inteiramente compreendidas, é sabido que o micro-organismo altera sua forma, para de se multiplicar, mas continua viável em condições extremas, como em altas temperaturas e baixo pH (Lamont *et al.*, 2012). É provável que a esporulação ocorra no queijo, uma vez que *Mycobacterium* não cresce no produto, mas se mantém viável (Spahr e Schafroth, 2001).

Os principais fatores deletérios para *M. bovis* e outras microbactérias em produtos lácteos são o pH e a presença de ácidos orgânicos, a concentração de sal, a umidade e a presença de microbiota competidora, principalmente BAL e suas bacteriocinas.

3.3.9.1. pH e ácidos orgânicos

O pH é, basicamente, a quantidade de íons H^+ disponíveis no produto. Essa característica apresenta dois efeitos adversos em micro-organismos indesejáveis: altera o funcionamento de enzimas e o transporte de nutrientes para a célula. Alguns produtos possuem uma acidez inerente, enquanto outros, devem seu pH à presença de uma microbiota acidificante. Independentemente da fonte da acidez, o efeito sobre micro-organismos indesejáveis apresenta os mesmos resultados (Jay *et al.*, 2005). É importante notar que o pH da maioria dos queijos encontra-se entre 4,9 e 5,9 (Fox *et al.*, 2004).

Bactérias do gênero *Mycobacterium* apresentam uma membrana celular capaz de manter a homeostase intracelular ao ejetar prótons, incluindo H^+ , por meio da F_1F_0 -ATPase (Rao *et al.*, 2001). Esses micro-organismos também formam grumos e, assim, aumentam sua capacidade de proteção. Apenas altas concentrações do íon H^+ podem matar esses micro-organismos, uma vez que os ácidos dissociados em grandes quantidades são absorvidos pelas micobactérias com um resultado fatal (Hrubant e Rhodes, 1989). Outros estudos também indicam que *M. bovis* e MAP são mais resistentes que outros patógenos em condições de baixo pH, possivelmente pelas características peculiares de sua parede celular (Rua-Domenech, 2006).

Ainda assim, a fermentação, acompanhada por diminuição de pH, já foi determinada como deletéria para *M. bovis*. Em estudo sobre viabilidade do patógeno durante a fermentação de kefir, os pesquisadores atribuíram um pH de 3,7 à inativação de *M. bovis* após 60 horas (Macuamule *et al.*, 2016).

Quanto a MAP, em estudo *in vitro*, o valor D (tempo para redução de um log de micro-organismo) em valores de pH 4, 5 e 6 foi de, respectivamente, 11, 17 e 21 dias ($p > 0,05$). No mesmo estudo, não foi possível determinar se esse micro-organismo foi capaz de desenvolver uma resposta frente ao ambiente ácido, pois os resultados obtidos nos três tempos foram estatisticamente iguais (Sung e Collins, 2003).

3.3.9.2. Umidade

A baixa umidade indisponibiliza água para sobrevivência de uma microbiota. Assim, não há um meio aquoso para que ocorram as reações químicas das atividades metabólicas de micro-organismos (Jay *et al.*, 2005). A atividade de água (A_w) é um parâmetro que indica água

disponível para uso bacteriano. Assim, ele pode ser como uma unidade de medição de umidade (Merwe e Michel, 2010).

Queijos artesanais apresentam variações em sua umidade, uma vez que esse parâmetro depende de tipo de produção e tempo de maturação. Queijos mais frescos e com menor força de prensagem apresentam uma maior Aw que aqueles maturados (Fox *et al.*, 2004). *Mycobacterium bovis* não é capaz de sobreviver em Aw menor que 0,95 (Merwe e Michel, 2010). Entretanto, MAP já foi encontrado e cultivado em fórmula infantil em pó, que apresenta Aw de 0,25 a 0,89 (Hruska *et al.*, 2011; Botsaris *et al.*, 2016). Assim, pode-se presumir que algumas bactérias do gênero *Mycobacterium* são capazes de sobreviver em condições hostis quanto à presença de água e essa habilidade pode ser aplicada em *M. bovis*.

3.3.9.3. Concentração de sal

A presença de sal também altera a disponibilidade de água de um queijo para uso por micro-organismos. Ainda que determinados autores sugiram que a concentração de sal em queijos maturados não é suficiente para eliminar micobactérias (Spahr e Schafroth, 2001), outros acreditam que produtos com menor concentração de sal favorecem a manutenção desses patógenos em queijos (Ikonomopoulos *et al.*, 2005).

3.3.9.4. Microbiota competidora

Alguns micro-organismos habituais de alimentos, como as bactérias ácido-láticas (BAL), presentes em derivados lácteos fermentados, são capazes de produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas. Associados com a disputa por nutrientes, a presença dessa microbiota e de seus metabólitos pode reduzir a concentração de patógenos e deteriorantes (Jay *et al.*, 2005). Sabe-se que *M. bovis* é dependente de piruvato para seu crescimento e as bactérias ácido-láticas são capazes de converter esse composto orgânico em lactato (Fox *et al.*, 2004). Portanto, pode haver indisponibilidade de piruvato, o que acarretaria em um crescimento ainda mais lento do patógeno.

Queijos artesanais podem apresentar ácido propiônico produzido por micro-organismos desejáveis. Em estudo francês, testou-se *in vitro* a sobrevivência de *M. bovis* BCG na presença desse composto orgânico. Como conclusão, sugeriu-se que o rápido crescimento de bactérias propiônicas e a formação desse gás pudessem eliminar *M. bovis* BCG (Meyer *et al.*, 1952). Em relação a MAP, não há registro de trabalho comparando a presença de gás propiônico e a sobrevivência do patógeno (Spahr e Schafroth, 2001).

Até mesmo a microbiota indesejável de queijos, como coliformes, fungos e bactérias do gênero *Staphylococcus*, podem atuar sobre a viabilidade de *M. bovis*, visto que também produzem ácidos orgânicos, bacteriocinas e consomem os nutrientes desses produtos lácteos (Tagg *et al.*, 1976; Forgrave *et al.*, 2016).

3.3.9.5. Bacteriocinas

Alguns micro-organismos habituais de alimentos, como as bactérias ácido-láticas (BAL), presentes em derivados lácteos fermentados, são capazes de produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas. Associados com a disputa por nutrientes, a presença dessa microbiota e de seus metabólitos pode reduzir a concentração de patógenos e deteriorantes (Jay *et al.*, 2005). Em estudos *in vitro*, bacteriocinas demonstraram ação deletéria contra componentes do gênero *Mycobacterium* (tabela 3.7).

Tabela 3.7. Bacteriocinas testadas contra micro-organismos do gênero *Mycobacterium*

Bacteriocina	Espécie produtora (fonte)	Espécie	Repressão de crescimento	Autores
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>M. smegmatis</i>	97,7% (redução de ATP)	Montville <i>et al.</i> , 1998
Nisina		<i>Mycobacterium smegmatis</i>	+**	Chung <i>et al.</i> , 2000
		<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	+**	
*	<i>Lactobacillus plantarum</i> (boza)	<i>M. tuberculosis</i>	69%	Todorov <i>et al.</i> , 2007
Lacticin 3147 e Nisina		<i>Mycobacterium tuberculosis H37Ra</i>	91% e 76,3%	Carroll <i>et al.</i> , 2010
		<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) ATCC 19698</i>	90,6% e 81%	
		<i>Mycobacterium kansasii CIT11/06</i>	93% e 94,5%	
Plantaricin E,F	<i>Lactobacillus plantarum</i> (queijo Kaseri)	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	+**	Gaggia <i>et al.</i> , 2010
Plantaricin E,F	<i>Lactobacillus plantarum</i> (queijo Esloveno)			
Enterocin A, P; Enterocin L50A–L50B	<i>E. faecium</i> (salsicha)			
Enterocin P; Enterocin L50A–L50B;	<i>Lactobacillus pentosus</i> (salsicha)		–**	
Enterocin P; Enterocin L50A–L50B;Pediocin AcH-PA1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (salsicha)			
*	<i>Aerococcus</i> spp.	<i>M. smegmatis</i>	+**	Zahir <i>et al.</i> , 2011
*	<i>Pediococcus pentosaceus</i> VJ13 (massa de Idly)	<i>M. smegmatis</i>	+**	Vidhyasagar e Jeevaratnam, 2013

*sem classificação

**não quantificada/sem comparação

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados por bactérias ácido-láticas em nível ribossomal (Donaghy, 2010). É sabido que não há necessidade de interação entre BAL e patógenos para que as bacteriocinas atuem sobre esses micro-organismos indesejados (Macuamule *et al.*, 2016). Esses peptídeos atuam sobre outros micro-organismos ao penetrarem na parede celular e se intercalarem com a membrana citoplasmática, ao reduzir o ATP intracelular (Montville *et al.*, 1998; Todorov *et al.*, 2007). Bacteriocinas podem ser classificadas como geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e sua síntese e presença em queijos artesanais já foi documentada em diversos estudos (Favaro *et al.*, 2015). Estima-se até que, frente a micobactérias resistentes a antibióticos, bacteriocinas possam ser uma opção no tratamento dessas doenças (Donaghy, 2010).

Em estudos com produtos lácteos experimentais, a presença de bactérias ácido-láticas também foi determinante para a redução de bactérias do gênero *Mycobacterium*. Ainda que os mecanismos de antagonismo não tenham sido elucidados, BAL foi capaz de diminuir a contagem do patógeno de forma significativa (tabela 3.8).

Tabela 3.8. Produtos lácteos suplementados com BAL e bactérias do gênero *Mycobacterium* com redução na concentração do patógeno

Produto lácteo	BAL	Espécie	Autores
Boza	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Todorov <i>et al.</i> , 2007
Leite fermentado	ND	<i>M.bovis</i>	Mariam, 2009
Leite acidófilo	<i>L. helveticus</i>		
Iogurte	<i>S. termophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	MAP	Van Brandt <i>et al.</i> , 2011
Kefir	Laktoflora*		
Leite acidófilo	<i>L. helveticus</i>	MAP	Klanicova <i>et al.</i> , 2012
Iogurte	<i>S. termophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>		
Leite fermentado	ND	<i>M.tuberculosis</i>	Mariam, 2014
Iogurte	<i>S. termophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	<i>M. bovis</i>	Nasr <i>et al.</i> , 2014
Kefir	ND		
Leite fermentado	<i>L. casei</i>	<i>M. bovis</i> BCG	Macuamule <i>et al.</i> , 2016
Leite fermentado	<i>L. paracasei</i>		
Leite fermentado	<i>L. lactis lactis</i>		

**Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Candida kefyr*

ND: não determinado

Ainda que esses estudos diversos apresentassem bons resultados de bacteriocinas e BAL contra micobactérias, a estabilidade e a disponibilidade, além de estudos *in vivo*, devem ser feitas para aplicação práticas dessas proteínas e bactérias (Carroll e O'Mahony, 2011).

3.3.10. *Mycobacterium bovis* x maturação de queijos

Pouco se sabe sobre o real impacto da maturação de queijos e a viabilidade de *M. bovis* ao longo do processo. Ainda que alguns estudos tenham tentado elucidar os fatores que eliminam ou não o patógeno, muitas lacunas ainda têm que ser preenchidas (Rowe e Donaghy, 2008).

Em trabalho pioneiro de 1935 com queijos maturados, foi pesquisada a presença de bacilo de *Mycobacterium* em produtos coletados do comércio. Foram testados queijo Cheddar, queijo Cheshire e queijo Stilton com até três meses de maturação. Os resultados determinaram que em 21 dias, o bacilo não estava presente nas amostras. Os autores sugeriram que a presença do bacilo em queijos pouco maturados e então sua ausência após um período maior de maturação indicam um processo de auto-esterilização (Pullinger, 1935). Ainda que o trabalho não contenha informações detalhadas sobre o experimento, é um marco na pesquisa e sobrevivência de *M. bovis* em queijos maturados.

Em queijos suíços Emmentaler e Tilsiter, *M. bovis* foi capaz de sobreviver por sete a 22 dias e por 305 dias, respectivamente. Os queijos haviam sido produzidos com leite cru naturalmente contaminado, com concentração do patógeno estimada de 1 a 10 UFC/mL. Não foi possível determinar o valor D uma vez que a presença do patógeno era confirmada por inoculação de cobaia e não por cultura seguida de contagem. No mesmo estudo, o patógeno foi capaz de causar a doença em porquinhos da índia após permanecer por 47 dias em queijo Camembert (Kästli e Binz, 1949, citados por Spahr e Schafroth, 2001).

Em 1950, a viabilidade de *M. bovis* foi testada em queijo branco francês. O patógeno foi adicionado ao leite antes da fabricação do queijo, em concentrações não especificadas. Após 14 dias da produção do queijo experimental, quatro cobaias foram consideradas positivas após inoculação de suspensão do queijo. A mesma metodologia foi aplicada com queijos de 17 dias, já em estado de deterioração, e os animais foram negativos. Assim, o autor concluiu que *M. bovis* foi capaz de sobreviver à metodologia de produção de queijo branco e que a fermentação não diminuiu a virulência dos mesmos. Entretanto, a proteólise após 17 dias foi suficiente para eliminar o patógeno. Segundo o autor, alguns micro-organismos proteolíticos sintetizam compostos antimicrobianos, que agiram contra *M. bovis* (Gearain, 1950).

Também em queijo Camembert, *M. bovis* não foi capaz de infectar cobaia após 60 dias de maturação. No mesmo trabalho, após 80 dias de maturação em queijo Edamer, o patógeno foi inoculado em porquinhos da índia e causou a doença nos animais (Frahm, 1959, citado por Pavlik *et al.*, 2009).

Na Alemanha, pesquisa com queijo Emmental foi incapaz de identificar *M. bovis* em 100 amostras do produto. Foram feitos, então, queijos experimentais inoculados com o patógeno, que permaneceu virulento, capaz de infectar cobaias, após três meses de maturação (Hahn, 1959, citado por Pavlik *et al.*, 2009).

Após a Segunda Guerra Mundial, o número de trabalhos envolvendo *M. tuberculosis* e *M. bovis* diminuiu consideravelmente na literatura científica mundial. Acreditava-se que as baixas incidência e prevalência da tuberculose determinariam seu eventual desaparecimento. Entretanto, a partir da década de 1980, com a epidemia de HIV e a presença de *M. tuberculosis* multirresistente na Rússia, a tuberculose voltou a ser alvo de pesquisa e interesse da comunidade científica internacional (Murray *et al.*, 2014). Nas décadas seguintes, o ressurgimento de tuberculose bovina no Reino Unido e a maior participação de países em desenvolvimento e

endêmicos para a doença na ciência mundial permitiram também um maior interesse por *M. bovis* (Rua-Domenech, 2006; Michel *et al.*, 2010). Assim, publicações tendo como objetivos a viabilidade de *M. bovis* em queijos e outros produtos lácteos reapareceram.

Na década de 1980, em trabalho com queijo azul contaminado artificialmente, *M. bovis* manteve-se viável após três a quatro meses de maturação. A inoculação de 1×10^4 UFC/mL do patógeno foi baseada na concentração de *M. bovis* excretada por glândulas mamárias de animais doentes. Ainda que o patógeno continuasse viável por esse período, percebeu-se uma diminuição de sua contagem a partir do 14º dia pós-produção (Lafont e Lafont, 1981, citados por Rowe e Donaghy, 2008).

A presença de uma comunidade binacional nos EUA, onde ocorria a importação não autorizada de produtos lácteos vindos do México, determinou a entrada de espigotipos mexicanos de *M. bovis* em território americano e o desenvolvimento da doença pelo consumo de queijo fresco, não maturado (Harris *et al.*, 2007). Os autores consideraram a falta de maturação como um dos fatores contribuintes à manutenção do patógeno no produto.

A escolha de melhor meio de cultura para selecionar *M. bovis* de queijos artesanais e o tempo de sobrevivência desse patógeno foram objetivos de dois trabalhos irlandeses de 2014 e 2016. Foram produzidos queijos Cheddar e Caerphilly inoculados experimentalmente com *M. bovis* em concentrações entre 10^3 a 10^4 UFC/mL. Os queijos foram então maturados por até 16 semanas a 12°C, sendo analisados por três meios de cultura durante as fases inicial, mediana e final da cura. Os valores $D_{12^\circ\text{C}}$ variaram entre 24 e 73 dias, de acordo com a concentração do inóculo, do tipo de queijo e da amostra de *M. bovis* utilizada. O patógeno, em uma das amostras, manteve-se viável após 373 dias de maturação, indicando a resistência do mesmo às condições adversas de um queijo maturado (Forgrave *et al.*, 2014; Forgrave *et al.*, 2016).

A sobrevivência de *M. bovis* foi testada em três queijos parmesão experimentais durante a cura por 63 dias em uma temperatura de 18°C. Verificou-se um valor $D_{18^\circ\text{C}}$ de 37,5 dias e, após esse período, o micro-organismo continuou viável (Starikoff *et al.*, 2016). É importante salientar que o tempo de maturação de um queijo parmesão ultrapassa os 63 dias considerados no trabalho, podendo chegar a até 30 meses.

A sobrevivência de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) também passou a ser estudada em leite e derivados (Spahr e Schafroth, 2001; Donaghy *et al.*, 2004; Cirone *et al.*, 2006; Hanifian, 2014a, Hanifian, 2014b). Ainda que esse micro-organismo não esteja comprovadamente ligado a doenças em humanos (Robertson *et al.*, 2017), a pesquisa de outras micobactérias durante a maturação de queijos ajuda a predizer o comportamento de *M. bovis* nos mesmos produtos (Macuamule *et al.*, 2016).

3.3.11. Formas de controle para tuberculose zoonótica

Embora a proporção de tuberculose humana causada por *M. bovis* seja muito menor que a causada por *M. tuberculosis*, sua gravidade e seus desdobramentos não devem ser subestimados (Michel *et al.*, 2010). Assim, o controle da tuberculose bovina e sua eventual erradicação terão um impacto positivo tanto na economia quanto na saúde pública humana (de Kantor *et al.*, 2008). Isso porque animais doentes nas formas subclínica ou clínica apresentam menor ganho de peso, menor produção de leite e maior condenação de carcaça no frigorífico (Bonsu *et al.*, 2000).

A pasteurização é capaz de eliminar por completo *M. bovis* do leite e, assim, reduzir de forma significativa a exposição do patógeno por indivíduos consumidores de produtos lácteos (Roug *et al.*, 2014). Em países cujo o alto valor do tratamento térmico industrial torna a prática inviável, espera-se uma incidência e uma prevalência maiores de tuberculose por *M. bovis* na população humana. Assim, a educação no campo e o desenvolvimento de práticas adequadas, como a fervura do leite, podem auxiliar no controle da doença em seres humanos (Bonsu *et al.*, 2000). O tratamento térmico caseiro é eficaz na redução da exposição ao patógeno e é uma forma de controle viável em locais onde há combustível, como lenha, suficientes. Entretanto, o mesmo sistema apresenta restrições, como o aumento da incidência de doenças pulmonares pela fumaça, o aumento do desmatamento ou o aumento das despesas com calor em situação de pobreza. Assim, formas alternativas de tratamento térmico, com o uso de fontes de energia alternativa, devem ser estudadas (Roug *et al.*, 2014). Outras formas de eliminar o patógeno em produtos lácteos também devem ser pesquisadas. O uso de BAL como fermento endógeno, a maturação de queijos e a fermentação de leite têm sido estudados como alternativas à pasteurização (Mariam, 2009; Michel *et al.*, 2015; Forgrave *et al.*, 2016; Macuamule *et al.*, 2016; Starikoff *et al.*, 2016).

Os programas de erradicação da doença em bovinos são essenciais para diminuir a incidência e a prevalência da doença em humanos (Torgerson e Torgerson, 2010). Eles baseiam-se principalmente no teste tuberculínico do gado, no abate de animais positivos e na restrição de movimentação quando há resultados suspeitos (Brooks-Pollock *et al.*, 2014). Acredita-se ainda que a eliminação de animais positivos seja a forma mais eficaz de se reduzir a incidência e a prevalência da doença (Roug *et al.*, 2014). Em países em desenvolvimento, a ajuda financeira por parte dos líderes mundiais deve ser considerada, principalmente para minimizar a situação de subsistência em que vivem (Thoen *et al.*, 2010). Em locais de baixo índice de desenvolvimento socioeconômico, a eliminação de rebanho positivo sem uma política de reposição de animais e de educação da população pode reduzir o índice de desenvolvimento local, o que deve ser evitado (Roug *et al.*, 2014). Em Minas Gerais, ainda que a legislação o contemple (Minas Gerais, 2002), não há um fundo governamental para indenização de produtores que tiveram seu gado abatido (Silveira, 2015). Em 2017, entretanto, foi encaminhado à Assembleia Legislativa do estado um projeto de lei para a criação de um fundo indenizatório em caso de emergência sanitária animal (Valverde, 2017).

Quando implantados de forma inadequada, programas governamentais de controle e erradicação podem ter consequências para as populações humanas e de animais, tanto domésticos quanto silvestres (Miller e Olea-Popelka, 2013). Esses programas não devem ser suspensos quando o objetivo principal for atingido e a doença for eliminada. Sistemas de vigilância devem manter-se atualizados quanto à incidência e à prevalência do patógeno, mesmo em locais onde ele já é considerado extinto (Roug *et al.*, 2014).

Programas de monitoramento da doença em humanos devem ser melhorados, especialmente em áreas endêmicas da tuberculose bovina. A ocorrência de casos deve ser imediatamente comunicada às autoridades sanitárias, para resolução da crise (Moda *et al.*, 2006). Sendo uma zoonose, tuberculose por *M. bovis* representa um risco maior em ambientes rurais ou áreas em que animais e humanos dividam o mesmo espaço. Assim, esforços médicos e veterinários devem ser coordenados para controlar e erradicar a doença em seres humanos e em animais (Prasad *et al.*, 2005, de Kantor *et al.*, 2008). Concomitantemente, médicos veterinários, agentes de saúde, fazendeiros e trabalhadores rurais devem ser submetidos a constantes exames para verificar suas

condições sanitárias, uma vez que podem ser carreadores de *M. bovis* e contaminar pessoas ou animais (Moda *et al.*, 2006).

Quanto a animais silvestres, a eliminação de todos os contaminados é de difícil aplicação. A captura, o teste tuberculínico e o abate podem causar um desequilíbrio dentro do ecossistema onde estão inseridos (Palmer *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo, a construção de barreiras físicas que impeçam o contato entre bovinos e silvestres também apresenta inconvenientes, como a mudança de práticas agrícolas e o impacto no meio ambiente (Musoke *et al.*, 2015). Acredita-se que a vacinação seja um caminho promissor. Entretanto, como diferentes animais selvagens são responsáveis pela manutenção de *M. bovis* em diversos países, é necessário ainda estudar a forma de entrega, a segurança e a eficácia da imunização (Palmer *et al.*, 2012).

A vacinação de animais não é permitida em países que apresentam um programa de erradicação, visto que o procedimento interfere no diagnóstico oficial (Bezoz *et al.*, 2014). Em seres humanos, alguns estudos determinam que um programa nacional de imunização pode ajudar no controle da doença (Rowe e Donaghy, 2008). Ainda assim, é sabido que a imunização é capaz de proteger principalmente crianças (Shah *et al.*, 2006) e, de acordo com alguns autores, deve ser foco principal de estudo no combate à doença tanto em humanos quanto em animais (Wedlock *et al.*, 2002; Amanfu, 2006). Um sistema de saúde em bom funcionamento, a integração do controle de tuberculose com o sistema direto de atendimento ao paciente, o fornecimento ilimitado dos medicamentos para tratamento da doença e um suporte externo efetivo são pontos indispensáveis para o sucesso na erradicação de tuberculose humana por *M. bovis* (Thoen *et al.*, 2006).

Ainda que utópica para um mundo desigual, a melhoria das condições de vida da população, principalmente em países em desenvolvimento, traria uma diminuição da incidência e prevalência de tuberculose humana por *M. bovis*. Isso porque o acesso a alimentos, a educação e a saúde são formas básicas de se diminuir a imunossupressão e a exposição ao patógeno (Moda *et al.*, 1996; Miller e Olea-Popelka, 2013; van Helden *et al.*, 2013).

4. Capítulo II - Bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal e seus antagonismos *in vitro* contra *Mycobacterium bovis* BCG

Artigo publicado no periódico “*International Journal of Dairy Technology*” online em 28 de junho de 2018 (doi: 10.1111/1471-0307.12540).

LETÍCIA GOULART DE OLIVEIRA,^{1*} GABRIELA OLIVEIRA E SILVA,¹ COSME DAMIÃO BARBOSA,² FELIPE MACHADO SANT’ANNA,¹ RENATA DIAS DE CASTRO,¹ NAIARA CHAVES FIGUEIREDO,¹ ÁLVARO CANTINI NUNES,³ ANDREY PEREIRA LAGE⁴ e MARCELO RESENDE DE SOUZA¹

¹ Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil, ² Departamento Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil, ³ Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil, and ⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil

*Autora para correspondência. E-mail: leticiagoliveira@yahoo.com Telefone: +55 31 996562587

Resumo

O consumo de leite cru e seus derivados é um fator de risco associado a tuberculose zoonótica. Bactérias ácido-láticas (BAL) apresentam atividade inibitória contra micobactérias. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antagonista *in vitro* de BAL isoladas de queijo Minas artesanal contra *Mycobacterium bovis* BCG. Nove BAL foram testadas contra *M. bovis* BCG em cinco ensaios de antagonismo *in vitro*. Quatro lactobacilli apresentaram os melhores resultados em todos os experimentos. Essa resposta pode ter sido por suas taxas de crescimento e produção de ácido e bacteriocina. Conclusivamente, BAL são capazes de diminuir a viabilidade de *M. bovis* BCG.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis* BCG, queijo Minas artesanal, bactérias ácido-láticas, inibição

4.1. Introdução

O consumo de leite não pasteurizado e seus produtos, especialmente queijo, tem aumentado (Yoon *et al.*, 2016). Conseqüentemente, várias agências estatais no mundo têm regulamentado a produção e comercialização de produtos seguros feitos a partir de leite cru. Ainda assim, esses produtos têm sido associados a um número crescente de doenças transmitidas por alimentos, como listeriose, campilobacteriose e tuberculose zoonótica (Mungai *et al.*, 2015; Verraes *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2016). A tuberculose zoonótica, causada principalmente pela ingestão do patógeno *Mycobacterium bovis*, tem sido reportada em diversos países (Müller *et al.*, 2013) e tem sido considerada uma doença infecciosa emergente por alguns autores (Welburn *et al.* 2015; El-Sayed *et al.*, 2016). O consumo de leite cru e seus produtos é tido como um dos principais fatores de risco associado à doença em humanos (Forgrave *et al.*, 2016).

Bactérias ácido-láticas (BAL) formam um grupo de micro-organismos benéficos comumente encontrados em leite cru e produtos lácteos não pasteurizados. Eles são capazes de controlar a

proliferação de patógenos e outras bactérias indesejáveis ao produzir principalmente ácidos orgânicos e bacteriocinas, mas também peróxido de hidrogênio, diacetil e acetoína (Klanicova *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2016). Os ácidos orgânicos agem rompendo a homeostase bacteriana, abaixando seu pH intracelular e também comprometendo a integridade da membrana plasmática (Macuamule *et al.*, 2016). Quanto às bacteriocinas, um grupo de peptídeos com propriedades inibitórias (Rowe e Donaghy, 2008), elas agem principalmente como formadoras de poros, causando a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática (Todorov *et al.*, 2008). Diversos testes *in vitro* já comprovaram a atividade inibitória de BAL contra micobactérias de crescimento rápido e lento (Zahir *et al.*, 2011; Vidhyasagar e Jeevaratnam, 2013). As bacteriocinas também já foram testadas contra micobactérias em produtos fermentados como boza (Todorov *et al.*, 2008), leite fermentado (Mariam 2014; Michel *et al.* 2015; Macuamule *et al.*, 2016); iogurte, kefir e leite acidófilo (Van Brandt *et al.*, 2011; Klanicova *et al.*, 2012) e queijo (Forgrave *et al.*, 2016). Ainda que BAL tenham demonstrado atividade antimicrobiana contra diferentes espécies de *Mycobacterium*, o seu modo de ação ainda está para ser totalmente elucidado.

Mycobacterium bovis é um patógeno responsável pela tuberculose, sobretudo em bovinos e búfalos. Adicionalmente, ele também pode causar a doença em seres humanos e outros animais. A principal rota de infecção em animais é por via aérea. In seres humanos, entretanto, a maioria dos casos está associada ao consumo de leite cru ou seus derivados contaminados (Rowe e Donaghy, 2008; Mungai *et al.*, 2015). *M. bovis* BCG é uma micobactéria atenuada, utilizada como vacina em seres humanos. No Brasil, o gado não é vacinado contra a tuberculose bovina, o que tornaria o aparecimento de *M. bovis* BCG impossível no leite. Entretanto, esse micro-organismo tem sido usado de forma experimental em pesquisas como uma alternativa a *M. bovis* (Rao *et al.*, 2001; Macuamule *et al.*, 2016). Isso porque esse micro-organismo é de manipulação mais segura e, ainda assim, prediz o comportamento do patógeno tanto *in vitro* quanto em outras situações, como em produtos lácteos.

Diversos estudos reportaram BAL isoladas de queijo Minas artesanal e diversos desses micro-organismos já foram testados contra patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Silva, 2015; Luiz *et al.*, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2016). Quanto a sua atividade contra *M. bovis*, nenhuma BAL isolada desses produtos lácteos foi testada tanto *in vitro* quanto *in situ*. Esse estudo é relevante, visto que a tuberculose bovina é endêmica no Brasil e essa doença, de caráter zoonótico, pode ser transmitida pelo consumo desses queijos (Barbieri *et al.*, 2016; Ferreira Neto *et al.*, 2016). Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar a atividade antagonista *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal e soro-fermento contra *Mycobacterium bovis* BCG.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Bactérias ácido-láticas e condições de cultura

Nove bactérias ácido-láticas foram isoladas de queijo Minas artesanal e soro-fermento de três regiões produtoras no estado de Minas Gerais: Serra da Canastra (Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014), Campo das Vertentes (Sant'Anna *et al.*, 2016) e Araxá (Silva, 2015; Luiz *et al.*, 2016). Elas haviam sido testadas, *a priori*, por suas características probióticas: tolerância a sais biliares e suco gástrico artificial, sensibilidade a antimicrobianos, antagonismos *spot-on-the-lawn* e co-cultura e produção de peróxido de hidrogênio. De 65 BAL isoladas em todos esses cinco testes, as melhores nove bactérias foram então selecionadas para esse experimento. Todas apresentaram resultados promissores quando comparadas às outras 56 BAL. É importante salientar também que

cada 3 BAL representaram uma das três regiões produtoras de queijo previamente descritas. As amostras de BAL foram identificadas taxonomicamente pelo seu perfil proteômico. Para isso, foi feita a análise de espectrometria de massa por dessorção-ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) no equipamento MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Billerica, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada ensaio de antagonismo, os micro-organismos foram cultivados em caldo MRS (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) por duas vezes a 37°C por 24 horas e então inoculados no meio específico para cada ensaio: ágar 7H11 (Tagg *et al.*, 1976), leite desnatado em pó reconstituído (Macuamule *et al.*, 2016), caldo 7H9 e caldo MRS (Hütt *et al.*, 2006). Esses inóculos finais também eram diluídos em salina peptonada 0,1% antes de serem plaqueados em ágar MRS (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) a 37°C por 48 horas para enumeração (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Designação, espécies, origem e referência das bactérias ácido-láticas

Designação	Espécies	Origem	Concentração final inóculo (log ₁₀ CFU mL ⁻¹)	Referência
A1C	<i>L. paracasei</i>	Queijo Minas artesanal	9.17	Costa <i>et al.</i> 2013 and Andrade <i>et al.</i> 2014
B7C	<i>L. paracasei</i>	Queijo Minas artesanal	9.66	
D1C	<i>L. rhamnosus</i>	Queijo Minas artesanal	8.68	Sant'Anna <i>et al.</i> 2016
1CV	<i>L. plantarum</i>	Soro-fermento	9.53	
56CV	<i>L. plantarum</i>	Queijo Minas artesanal	9.3	
26CV	<i>P. acidilactici</i>	Queijo Minas artesanal	9.41	Silva 2015; Luiz <i>et al.</i> 20 2016
A1A	<i>L. rhamnosus</i>	Queijo Minas artesanal	9	
A6A	<i>L. rhamnosus</i>	Queijo Minas artesanal	9.11	
E35A	<i>L. brevis</i>	Queijo Minas artesanal	9.56	

4.2.2. *Mycobacterium bovis* BCG e condições de cultura

Uma amostra de *M. bovis* BCG Monreau foi doado pelo Laboratório Nacional de Agropecuária (LANAGRO-MG) em caldo Middlebrook 7H9. Para a preparação do inóculo, uma alíquota de 100µL foi transferida para 5mL de caldo 7H9 (Difco, Livonia, MI, EUA), suplementado com 10% de enriquecimento Middlebrook OADC (Difco), 0,5% de piruvato de sódio (Neon, São Paulo, SP, Brasil) e 0,05% de Tween 80 (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A amostra foi então incubada em ágar 7H11 (Difco, Livonia, MI, EUA) a 37°C por cinco dias, quando o inóculos da micobactéria atingiu uma concentração final de 8,8 log₁₀ UFC mL⁻¹.

Uma amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo. A bactéria foi crescida por duas vezes a 37°C em caldo BHI (BD Difco, Franklin Lakes, EUA) por 24 horas, como descrito previamente (Tagg *et al.* 1976; Hütt *et al.* 2006; Macuamule *et al.* 2016).

4.2.3. Atividade antagonista *spot-on-the-lawn*

As bactérias ácido-láticas foram testadas previamente para crescimento em ágar 7H11. Como foram capazes de formar colônias, 10 μ L de cada amostra foi colocada no centro de uma placa de Petri de vidro contendo ágar 7H11. As placas foram então incubadas a 37°C por 48 horas, quando as LAB formaram os *spots* sobre o ágar (Tagg *et al.*, 1976). Esses spots foram então inativados com exposição ao clorofórmio (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) por 30 minutos, seguido pela exposição à luz UV por outros 30 minutos. Um volume de 10 μ L de *M. bovis* BCG em uma concentração de 8,8 log₁₀ UFC mL⁻¹ foi adicionado a 4mL de caldo 7H9 semissólido (0,75%) e plaqueado sobre a superfície do ágar 7H11 contendo os *spots* inativados de BAL. As placas foram então incubadas a 37°C por cinco dias e os halos de inibição formados foram medidos com um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, SP, Brasil).

4.2.4. Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas em leite fermentado

O leite foi preparado com a reconstituição de 20g de leite em pó desnatado (Itambé, Belo Horizonte, MG, Brasil) em 50mL de água destilada esterilizada. O produto foi então inoculado com 1% de *M. bovis* BCG (8,8 log₁₀ UFC mL⁻¹) e a mesma porcentagem de cada BAL em sua concentração final (tabela 4.1) (Macuamule *et al.*, 2016). O leite foi então fermentado a 37°C por cinco dias.

A qualidade microbiológica do leite foi testada previamente para contagens de *Staphylococcus aureus* (Lancette e Tatini, 2001), coliformes totais e termotolerantes (Ginn *et al.* 1985), assim como para a presença de *Salmonella* spp. (Andrews *et al.*, 2001).

4.2.5. Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas em caldo 7H9

Um volume de 100 μ L de *M. bovis* BCG em uma concentração de 8,8 log₁₀ UFC mL⁻¹ e 100 μ L de cada BAL na sua concentração final (tabela 4.1) foram adicionados a 10mL de caldo 7H9 suplementado com 10% de enriquecimento Middlebrook OADC, 0,5% de piruvato de sódio e 0,05% de Tween 80 e incubados por cinco dias a 37°C.

4.2.6. Atividade antagonista de sobrenadante de bactérias ácido-láticas

Cada BAL foi cultivada em 5mL de caldo MRS a 37°C. Após 24 horas, os caldos eram centrifugados (5,000 g por 15 minutos) e seus sobrenadantes foram autoclavados a 121°C por 15 minutos ou, em paralelo, filtrados por seringa de poro tamanho 0,22 μ m. Um volume de 4mL de cada sobrenadante foi coletado e adicionado a 4mL de caldo 7H9 suplementado com 10% de enriquecimento Middlebrook OADC, 0,5% de piruvato de sódio e 0,05% de Tween 80. Um inóculo de 1% de *M. bovis* BCG em uma concentração de 8,8 log₁₀ UFC mL⁻¹ foi então adicionado a cada combinação de caldos MRS e 7H9 e incubado a 37°C por cinco dias (Hütt *et al.* 2006).

4.2.7. Enumeração bacteriana

Após o período de cinco dias de incubação para todos os ensaios de antagonismo, as contagens de BAL foram feitas em ágar MRS, incubado a 37°C por 48 horas (MacFaddin, 1980) e as de *M. bovis* BCG, em ágar 7H11 (Difco) suplementado com 10% de enriquecimento Middlebrook OADC, 0,5% de piruvato de sódio e 0,05% de Tween 80. Quando as BAL estavam viáveis, as amostras eram plaqueadas em ágar 7H11 também suplementado com estolato de eritromicina (Ache, Guarulhos, SP, Brasil) a 4%. Isso porque todas as BAL haviam demonstrado previamente

(Costa *et al.* 2013; Andrade *et al.*, 2014; Silva, 2015; Luiz *et al.*, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2016) sua susceptibilidade contra eritromicina nessa concentração. O pH foi medido em todos os caldos e leites fermentados do controle com um pHmetro digital (mPA-210, Piracicaba, SP, Brazil). Isso porque, ainda que atenuado, *M. bovis* BCG é um patógeno e poderia contaminar o equipamento.

Os ensaios antagonistas foram realizados em triplicata com duas repetições independentes. Como a distribuição Gaussiana não foi atingida, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para determinar se havia diferença significativa entre os grupos (nível de significância de 95%). O pós-teste de Bonferroni foi então utilizado para comparar as medianas de cada tratamento. Todas as análises estatísticas foram rodadas no software GraphPad Prism 6.01.

4.3. Resultados e discussão

O ensaio *spot-on-the-lawn* não evidenciou qualquer atividade antagonista contra *M. bovis* BCG. Ainda que todas as BAL tenham formado o *spot* sobre o ágar 7H11, a micobactéria foi capaz de formar colônias tipo tapete sobre todos os *spots*. O ágar 7H11 pode ter inibido a redução de pH ou a produção de bacteriocina ao redor pelas BAL. Ambos os mecanismos já foram demonstrados como efetivos contra a viabilidade de *M. bovis* BCG e outras micobactérias (Carroll *et al.*, 2010; Gaggia *et al.*, 2010). A falta de acidificação do meio ocorreu provavelmente por sua constituição com piruvato, já que BAL utilizam esse açúcar como fonte de carboidrato, o que permite sua multiplicação. Esse processo fermentativo resulta em formação de lactato, que não diminui o pH do ambiente (Liu, 2003). A ausência de bacteriocinas pode também ser pelo meio utilizado. É sabido que, para que haja produção desses peptídeos, BAL devem encontrar uma série de condições ótimas como pH, presença de certos carboidratos e nitrogênio orgânico, e até altas taxas de crescimento (Macuamule *et al.*, 2016). É provável que essas condições, que estão intrinsicamente conectadas, não foram atingidas, o que pode ter resultado na ausência de bacteriocinas. Portanto, *M. bovis* BCG foi capaz de crescer livremente nesse ensaio.

Como visto na tabela 4.2, *M. bovis* BCG apresentou redução em suas contagens após cinco dias quando crescido concomitantemente em leite fermentado por seis das BAL testadas. Deve-se notar que a qualidade microbiológica do leite em pó reconstituído foi satisfatória, com contagens nulas de *S. aureus*, coliformes totais e termotolerantes e ausência de *Salmonella* spp.

Mycobacterium bovis BCG foi capaz de sobreviver em concentração de $3 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ quando não se encontrava em contato com outra BAL no leite fermentado, mesmo após cinco dias de fermentação. Os mesmos resultados foram reportados em diferentes trabalhos, em que *M. bovis* e *M. bovis* BCG foram inoculados em leite pasteurizado e sobreviveram após sete ou 84 horas, respectivamente (Mariam, 2009; Macuamule *et al.*, 2016). A presença da micobactéria também não interferiu no pH do leite e o mesmo resultado foi encontrado quando *Mycobacterium avium* *paratuberculosis* (MAP) foi cultivado em leites fermentados (Klanicova *et al.*, 2012).

As amostras *L. paracasei* A1C, *L. plantarum* 1CV e 56CV e *L. rhamnosus* D1C, A1A e A6A foram capazes de reduzir significamente ($P < 0,05$) as contagens de *M. bovis* BCG em leite fermentado por cinco dias. O gênero *Lactobacillus* é conhecido por sua capacidade de produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas, mecanismos deletérios para diversos micro-organismos. Ainda que o mecanismo exato de inibição não tenha elucidado, o declínio considerável do patógeno atenuado pode ser associado a um pH mais baixo que 4,19. Sabe-se que concentrações de ácidos orgânicos, incluindo ácido lático, pode resultar em completa inibição do crescimento de micobactérias, ainda que esse gênero seja considerado como ácido-resistente (Michel *et al.* 2015).

Tabela 4.2. Contagens médias de *M. bovis* BCG em ágar 7H11 e de BAL em ágar MRS após cinco dias de crescimento concomitante em leite desnatado fermentado

	<i>M. bovis</i> BCG (log ₁₀ CFU mL ⁻¹)	BAL (log ₁₀ CFU mL ⁻¹)	pH de leite desnatado fermentado
<i>L. paracasei</i> A1C	0.47*	8.25	3.99
<i>L. paracasei</i> B7C	0.7	8.63	5.09
<i>L. rhamnosus</i> D1C	0.35*	8.96	3.77
<i>L. plantarum</i> 1CV	0*	7.73	4.19
<i>P. acidilactici</i> 26CV	1.13	9.08	4.86
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	7.38	4.15
<i>L. rhamnosus</i> A1A	0*	9.39	3.78
<i>L. rhamnosus</i> A6A	0.16*	8.06	3.77
<i>L. brevis</i> E35A	1.13	8.16	5.14
Controle	3.1	-	6.17

* $P < 0.05$ Comparado com controle (teste de Kruskal-Wallis)

As amostras *L. plantarum* 1CV, *L. plantarum* 56CV e *L. rhamnosus* A1A demonstraram a maior eficiência, uma vez que inibiram completamente o crescimento de *M. bovis* BCG. Os pH de seus leites fermentados variaram entre 3,78 a 4,19, e essa ampla faixa pode indicar que outros compostos antimicrobianos tenham interferido no processo.

Apenas três BAL, *L. paracasei* B7C, *P. acidilactici* 26CV e *L. brevis* E35A, não foram capazes de diminuir a presença do patógeno atenuado quando comparado com o controle. Pode-se notar que suas contagens permaneceram altas, entre 8,16 a 9,08 log₁₀ UFC mL⁻¹, após a fermentação do leite. O pH desses leites, entretanto, permaneceram entre 4,86 e 5,14, alcançando os maiores valores entre as BAL testadas. Portanto, a acidez do produto lácteo parece ter influenciado diretamente a sobrevivência de *M. bovis* BCG. Deve-se notar também que, ainda que tenha havido uma diminuição nas contagens do patógeno atenuado, essa micobactéria permaneceu viável mesmo quando em competição com essas três BAL pelos nutrientes do leite, o que pode indicar sua habilidade em sobreviver em produtos comerciais.

Lactobacillus paracasei A1C e *L. paracasei* B7C apresentaram efeitos opostos na sobrevivência de *M. bovis* BCG. Esse resultado pode sugerir que os efeitos causados sobre o patógeno testado pode ser intrínseco a cada amostra ou micro-organismo e independe apenas da espécie testada.

Diversos estudos já reportaram a sobrevivência de *M. bovis*, *M. bovis* BCG e de outras micobactérias em produtos fermentados, especialmente aqueles contendo bactérias do gênero *Lactobacillus*.

Em um estudo etíope, duas espécies não identificadas de *Lactobacillus*, isoladas de um leite fermentado tradicional, foram fermentadas por 15 dias concomitantemente com *M. bovis* em leite tratado termicamente. A amostra cultivada isoladamente com o patógeno não foi capaz de reduzir suas contagens. Entretanto, o outro lactobacilo, quando adicionado ao leite com uma mistura de BAL mesofílicas, determinou o não isolamento de *M. bovis* (Mariam, 2009). O mesmo autor, sem especificar a BAL, demonstrou que leite fermentado feito com leite cru foi capaz de erradicar *Mycobacterium tuberculosis* após sete dias (Mariam, 2014). Também utilizando leite cru, um estudo sul-africano indicou que *M. bovis* permaneceu viável após duas semanas em temperatura de 22°C. Entretanto, quando o leite era fermentado a 33°C, similar ao presente estudo, o patógeno tornava-se ausente após três dias (Michel *et al.*, 2015). Em outro trabalho do mesmo país, *L. casei*

e *L. paracasei* foram capazes de eliminar *M. bovis* BCG após 60 horas em leite fermentado (Macuamule *et al.*, 2016).

Em estudo realizado na Bélgica, MAP permaneceu viável mesmo após seis semanas em leite fermentado (pH final de 3,8) feito com uma combinação de *L. casei* e *L. rhamnosus*. As contagens do patógeno bovino tiveram uma redução de 1,8 a 2,2 log₁₀ UFC mL⁻¹ durante esse período, de acordo com a amostra de MAP utilizada. O declínio, entretanto, não foi significativo quando comparado à amostra controle (Van Brandt *et al.*, 2011), assim como visto no presente trabalho com as amostras *L. paracasei* B7C, *P. acidilactici* 26CV e *L. brevis* E35A. Deve-se notar que, embora alguns resultados sejam compatíveis àqueles apresentados, sabe-se que MAP é capaz de sobreviver em condições desfavoráveis, superando aquelas apresentadas por *M. bovis* BCG para sobreviver (Van Brandt *et al.*, 2011).

Lactobacillus bulgaricus e *Lactobacillus acidophilus*, associados a outras BAL, foram responsáveis por um decréscimo discreto nas contagens de MAP em iogurte e leite fermentado em estudo da Tchécua. No mesmo trabalho, entretanto, *Lactobacillus helveticus* sozinho foi capaz de reduzir significativamente as contagens do patógeno durante a fermentação. Os autores indicaram que, assim como no presente estudo, o pH atuou de forma crítica na sobrevivência de MAP e que, quando seu valor se encontrava abaixo de 4, as chances de inativação da micobactéria eram maiores (Klanicova *et al.* 2012).

A tabela 4.3 demonstra os resultados de *M. bovis* BCG e BAL incubadas concomitantemente em caldo 7H9 por cinco dias. Quando comparadas às contagens do patógeno atenuado no controle (5,6 log₁₀ UFC mL⁻¹), em todas as amostras BAL foi capaz de inibir a presença da micobactéria.

Tabela 4.3. Contagens médias de *M. bovis* BCG em ágar 7H11 e de BAL em ágar MRS após cinco dias de crescimento concomitante em caldo 7H9

	<i>M. bovis</i> BCG (log ₁₀ CFU mL ⁻¹)	LAB (log ₁₀ CFU mL ⁻¹)	pH caldo 7H9
<i>L. paracasei</i> A1C	1.13*	6.39	6.66
<i>L. paracasei</i> B7C	0*	6.2	6.56
<i>L. rhamnosus</i> D1C	0.56*	6.85	6.49
<i>L. plantarum</i> 1CV	0.87*	6.92	6.49
<i>P. acidilactici</i> 26CV	1.13*	7.04	6.49
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	6.98	6.42
<i>L. rhamnosus</i> A1A	1.13*	5.47	6.5
<i>L. rhamnosus</i> A6A	1.69*	6.39	6.57
<i>L. brevis</i> E35A	1.13*	6.23	6.51
Controle	5.6	-	6.66

**P* < 0.05 Comparado com controle (teste de Kruskal-Wallis)

Não há, na literatura consultada, registros do crescimento de BAL em caldo 7H9. Entretanto, pode-se determinar que esses micro-organismos foram capazes de se multiplicarem no meio, uma vez que, após cinco dias de incubação a 37°C, suas contagens variaram de 5,47 a 7,04 5,6 log₁₀ UFC mL⁻¹. Ainda que as BAL tenham atingido essas concentrações, elas não foram capazes de acidificar o caldo. Mais uma vez, a constituição de piruvato de sódio do caldo 7H9 pode ter sido responsável pela manutenção de pH (Liu, 2003). Esses resultados reforçam o conceito de que, ainda que a acidez do meio desempenhe um papel primordial na eliminação de *M. bovis* BCG, outros fatores podem ser responsáveis pela redução dessa micobactéria, como visto nesse ensaio.

A principal hipótese para a redução significativa de *M. bovis* BCG seria sua fastidiosidade. Ainda que o meio utilizado é específico para o crescimento de micobactérias (Forgrave *et al.*, 2014), a taxa lenta de crescimento desses micro-organismos pode ter estabelecido uma desvantagem nutricional. Uma vez que BAL apresentam um tempo de geração mais rápido, elas podem ter consumido os nutrientes do meio e assim, *M. bovis* BCG, fastidioso, teve menos recursos nutricionais para se multiplicar. A competição por nutrientes entre *M. bovis* e BAL já foi reportada por outros autores, que declaram que esse fator pode diminuir o crescimento do patógeno (Michel *et al.*, 2015; Verraes *et al.*, 2015; Forgrave *et al.*, 2016).

Como visto na tabela 4.4, o sobrenadante esterilizado das BAL foi capaz de reduzir as contagens de *M. bovis* BCG em quase todas as amostras testadas.

Tabela 4.4. Contagens médias (\log_{10} CFU mL⁻¹) de *Mycobacterium bovis* BCG em 7H11 após cinco dias de crescimento em sobrenadante (caldos 7H9 e MRS) autoclavados ou filtrado de BAL

	Sobrenadante autoclavado (\log_{10} CFU mL ⁻¹)	Sobrenadante filtrado (\log_{10} CFU mL ⁻¹)	pH do sobrenadante
<i>L. paracasei</i> A1C	0.34*	0*	4.34
<i>L. paracasei</i> B7C	0*	0. *	4.27
<i>L. rhamnosus</i> D1C	0.97*	0.9*	4.29
<i>L. plantarum</i> 1CV	0.41*	0.38*	4.18
<i>P. acidilactici</i> 26CV	0*	0.5*	4.3
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	0*	4.1
<i>L. rhamnosus</i> A1A	1.05	0.56 *	4.25
<i>L. rhamnosus</i> A6A	0.16*	0.2*	4.24
<i>L. brevis</i> E35A	2.26	2.45	5.07
Controle		6.98	6.4

* $P < 0.05$ Comparado com controle (teste de Kruskal-Wallis)

Com exceção das amostras *L. rhamnosus* A1A e *L. brevis* E35A, os sobrenadantes de todas as outras BAL testadas foram capazes de reduzir ($P < 0,05$) as contagens de *M. bovis* BCG em ambos os ensaios quando comparados com o controle. Esse resultado pode ser tanto devido à presença de bacteriocinas quanto pela produção de ácidos orgânicos. Micobactérias são reconhecidas como resistentes a um baixo pH pela sua membrana plasmática, mais espessa que a de outras bactérias e que permite agrupamento, aumentando a proteção celular (Rao *et al.*, 2001). Nesses ensaios, entretanto, as reduções significativas de contagem de *M. bovis* BCG estavam associadas com os menores valores de pH. Diversos autores já demonstraram que, quando o pH do meio se encontra abaixo de 4,5, a sobrevivência de micobactérias pode ser atingida (Michel *et al.*, 2015; Forgrave *et al.*, 2016). Portanto, a acidez dos sobrenadantes pode ter agido diretamente contra o patógeno atenuado, diminuindo suas contagens depois de cinco dias na mistura dos caldos 7H9 e MRS. Uma vez que bacteriocinas apresentam melhores resultados quando em baixo pH, a acidez dos caldos pode também ter, indiretamente, agido contra *M. bovis* BCG (Carrol *et al.*, 2010). Como nesse experimento, se o pH não se encontrava abaixo de 4,2, então a presença de bacteriocinas e outros agentes antimicrobianos pode ser considerada para explicar a inibição contra *M. bovis* BCG.

Deve-se notar que, mesmo quando o teste foi conduzido com o sobrenadante autoclavados, houve um decréscimo nas contagens do patógeno atenuado. Esse resultado pode sugerir que, se a inibição foi associada a bacteriocinas, esses peptídeos eram, nesse caso, termoestáveis. A

presença de bacteriocinas pode ser corroborada pelo ensaio realizado previamente em caldo 7H9, em que *M. bovis* BCG e BAL foram inoculados concomitantemente. Já que não houve acidificação do meio e, ainda assim, o patógeno atenuado demonstrou contagens menores, outros fatores, como a presença de bacteriocinas, pode ter influenciado contagens inferiores de *M. bovis* BCG. Pode-se observar também que, no caso dos sobrenadantes, não houve competição pelos nutrientes presentes no caldo 7H9, visto que a micobactéria foi adicionada em sobrenadantes estéreis. Isso pode ser corroborado pelo fato que, como reportado por Macuamule *et al.* (2016), a interação direta entre patógeno e micro-organismos inibitórios não é obrigatória para que haja efeito antimicrobiano. Ainda que em meio diferente, MAP adicionado em leite fermentado estéril teve sua viabilidade reduzida, especialmente em pH menor que 4 (Klanicova *et al.*, 2012). Esse dado reforça a hipótese de que o declínio na viabilidade de *M. bovis* BCG foi causado pelo efeito inibitório de BAL isolada de queijo Minas artesanal e seu soro-fermento.

Um ensaio similar foi realizado com *M. tuberculosis*, MAP e *Mycobacterium kansasii* em caldo 7H9. Entretanto, ao invés de sobrenadantes, duas bacteriocinas diferentes, nisina e lactocina, foram testadas. Ainda que nesse estudo todos os testes antagonistas fossem feitos em pH igual a 7, a micobactéria apresentou susceptibilidade significativa para ambas as bacteriocinas testadas (Carrol *et al.*, 2010). MAP também foi testado contra bacteriocinas isoladas de duas amostras distintas de *L. plantarum*, também isoladas de queijo. Ambas também apresentaram atividade inibitória contra o patógeno em caldo MRS (Gaggia *et al.*, 2010). Bacteriocinas isoladas de BAL também foram eficazes contra *M. tuberculosis* em dois testes in vitro (Todorov *et al.*, 2008) e, em condições similares, contra *Mycobacterium smegmatis* (Zahir *et al.*, 2011; Vidhyasagar e Jeevaratnam 2013).

L. rhamnosus A1A foi capaz de diminuir ($P < 0,05$) as contagens de *M. bovis* BCG apenas com o sobrenadante filtrado. Uma vez que o sobrenadante autoclavados não apresentou resultados satisfatórios, o componente causando a inibição era termolábil e não resistiu às altas temperaturas e alta pressão da autoclave. Quanto a *L. brevis* 35A, ambos os sobrenadantes foram incapazes de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG. Mais uma vez, o pH atingido por esse micro-organismo foi o maior quando comparado ao das outras BAL. O mesmo resultado foi observado no ensaio de leite fermentado, em que *L. brevis* 35A não diminui as contagens da micobactéria e manteve o pH do meio acima de 5.

4.4. Conclusão

De acordo com todos os ensaios, BAL e seus sobrenadantes são capazes de diminuir ou completamente suprimir o crescimento de *M. bovis* BCG em diferentes situações. Ainda que o principal mecanismo de inibição não tenha sido elucidado, o pH desempenhou um papel importante na inibição. Ainda assim, a presença de bacteriocinas pode ser inferida, especialmente nos ensaios em que o pH ficou próximo da neutralidade.

Cada BAL demonstrou um padrão de inibição diferente quando confrontada com o patógeno atenuado. Esse resultado pode ser devido a suas características intrínsecas, como taxa de crescimento, produção de ácido e bacteriocina nos diferentes meios testados (leite em pó desnatado reconstituído e caldos 7H9 e MRS).

Ainda que a classificação de BAL não tenha sido o principal objetivo desse estudo, apresentaram os melhores resultados nas avaliações antagonistas. Assim, esses micro-organismos podem ser estudados futuramente quanto às suas propriedades inibitórias contra *M. bovis*, seus usos

industriais e suas características probióticas. Eventualmente, essas BAL podem também ser utilizadas para o desenvolvimento de produtos lácteos mais seguros.

4.5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos Laboratórios Nacionais Agropecuários – Minas Gerais (LANAGRO-MG) pelo fornecimento da amostra de *Mycobacterium bovis* BCG. Esse estudo foi financiado por Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. Capítulo III - Influência da maturação sobre a viabilidade de *Mycobacterium bovis* BCG em queijos tipo Minas artesanal

5.1. Introdução

A produção de queijo Minas artesanal baseia-se na utilização de leite cru como principal matéria prima. Como a tuberculose bovina é endêmica no estado de Minas Gerais, tornam-se necessários estudos aprofundados para determinar a sobrevivência de *Mycobacterium bovis*, o agente causador de tuberculose bovina e zoonótica, nesse tipo de queijo. Esse é, portanto, o objetivo do capítulo III, escrito a seguir.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Tratamentos

Para determinação da viabilidade de *Mycobacterium bovis* BCG em queijos tipo Minas artesanal, foram produzidos 72 queijos segundo o esquema fatorial 3x8: três tratamentos x oito tempos de maturação, considerando-se três repetições. Os tratamentos foram divididos em:

- Queijos tratamento A: *M. bovis* BCG a 10^5 UFC/mL e *Lactobacillus paracasei* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1 a 10^8 UFC/mL cada.
- Queijos tratamento B: *M. bovis* BCG a 10^5 UFC/mL.
- Queijos tratamento C: sem inoculação (queijo controle).

Os queijos foram analisados nos dias 1, 8, 15, 22, 29, 45, 60 e 90 pós-produção.

Nesses tempos, todos os queijos foram analisados quanto à contagem de *M. bovis* BCG (Forgrave *et al.*, 2014) e bactérias ácido-láticas (MacFaddin, 1980). Os queijos controle também foram analisados, nos mesmos períodos, para contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo (Brasil, 2003), coliformes a 30°C e a 45°C (Ginn *et al.* 1985) e para presença de *Salmonella* spp. (Brasil, 2003); e quanto aos seus parâmetros físico-químicos: teores percentuais de extrato seco total e umidade, gordura, compostos nitrogenados e cloretos, além de determinações de acidez titulável e pH (Brasil, 2006).

5.2.2. Origem de *Mycobacterium bovis* BCG, *Lactobacillus paracasei* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1

O micro-organismo utilizado durante o experimento foi o *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, gentilmente cedido por Laboratórios Nacionais Agropecuários – Minas Gerais (LANAGRO-MG), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sua identidade foi confirmada geneticamente por presença de IS1081 (Sales *et al.*, 2014).

Lactobacillus paracasei B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1 pertencem à coleção de bactérias ácido-láticas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Ambos foram isolados de queijo Minas artesanal da Canastra em 2009 e, desde então, têm sido avaliados quanto a suas propriedades probióticas, seus antagonismos frente a diversos patógenos e suas características sensoriais (Resende *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Oliveira, 2016; Acurcio *et al.*, 2017a; Acurcio *et al.*, 2017b). Suas identidades foram confirmadas de acordo com seus perfis proteômicos. Para isso, foi feita a análise de espectrometria de massa por dessorção-ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) no equipamento MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Billerica,

MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (TeKippe e Burnham, 2014; Lévesque *et al.*, 2015).

5.2.3. Curva de crescimento

Ainda que demoradas, as curvas de crescimento são a melhor maneira de medir o crescimento e a concentração de micro-organismos viáveis em uma suspensão bacteriana (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). Considerando o volume inicial de leite de cada tratamento (16000mL), para que uma concentração final de 10^5 UFC/mL de *M. bovis* BCG nos queijos submetidos à maturação fosse atingida, os inóculos iniciais desse micro-organismo deveriam apresentar uma contagem bacteriana aproximada de 10^{10} UFC. O inóculo inicial de cada BAL deveria apresentar uma concentração bacteriana aproximada de 10^{12} UFC para atingir uma concentração de 10^8 UFC/mL nos queijos frescos.

Para determinar o tempo de crescimento dos micro-organismos para produção dos inóculos de *M. bovis* BCG, *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1 a serem adicionados nos queijos, foram realizadas curvas de crescimento em triplicata para cada um.

5.2.3.1. *Mycobacterium bovis* BCG

Para a produção da curva, 100µL de uma amostra ativa de *M. bovis* BCG foi ressuspensa em 10mL de caldo 7H9 (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), suplementado com Middlebrook OADC a 10% (Difco, Livonia, MI, EUA), 0,5% de piruvato de sódio (Neon, São Paulo, SP, Brasil) e 0,05% de Tween 80 (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Allen, 1998; Robbe-Austerman *et al.*, 2013; Forgrave *et al.*, 2014). A amostra era considerada ativa quando permanecia por 15 dias, após descongelamento, no mesmo meio de cultura.

O caldo 7H9 (BD Difco) foi adicionado de Middlebrook OADC com o intuito de favorecer a síntese da membrana plasmática (ácido oleico), eliminar substâncias tóxicas (albumina), fornecer carboidrato (dextrose) e retirar peróxido do meio (catalase) (Allen, 1998). O piruvato de sódio também é fonte de energia para o *M. bovis* (Allen, 1998) e o Tween 80 age como um detergente, dificultando o crescimento em grumos do micro-organismo (Forgrave *et al.*, 2014; Forgrave *et al.*, 2016).

Após cinco dias, foram congeladas alíquotas do micro-organismo em uma solução de 65% do mesmo caldo e 35% de glicerina 50%. Dessa mesma suspensão bacteriana, foram retiradas sete amostras de 500µL. Cada amostra foi então inoculada em um erlenmeyer com 50mL da mesma formulação do caldo 7H9 e mantida por até sete dias a 37°C. A cada 24 horas, um erlenmeyer era retirado da estufa e, após sucessivas diluições em salina peptonada 0,1%, 100µL eram plaqueados em ágar 7H11 (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), suplementado com Middlebrook OADC a 10% (Difco, Livonia, MI, EUA), 0,5% de piruvato de sódio (Neon, São Paulo, SP, Brasil) e 0,05% de Tween 80 (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Robbe-Austerman *et al.*, 2013; Forgrave *et al.*, 2014). As placas eram então revestidas por Parafilm (Bemis, Oshkosh, WI, EUA), para que o ágar não ressecasse, e mantidas em estufa 37°C por até dez dias, quando ocorreu a contagem de colônias.

5.2.3.2. *Bactérias ácido-láticas*

Cem microlitros dos dois micro-organismos de escolha, *Lactobacillus paracasei* B7 e *Lactobacillus rhamnosus* D1, em concentração desconhecida, foram inoculados separadamente em 10mL de caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) a 37°C por 24

horas (Hütt *et al.*, 2006). Um repique idêntico foi feito e, após outras 24 horas a 37°C, foram congeladas alíquotas dos lactobacilos em uma suspensão de 65% de caldo MRS e 35% de glicerina 50%.

A cada curva, uma alíquota de cada BAL era descongelada a 8°C por 60 minutos. Cem µL dessa suspensão bacteriana eram adicionados em 10mL de caldo MRS por 24 horas a 37°C. Esse foi considerado o inóculo para a curva de crescimento das duas BAL. A partir de então, 500µL dessa suspensão final eram adicionados em 12 erlenmeyers contendo 50mL de caldo MRS, que foram incubados por 24 horas a 37°C. A cada duas horas, um erlenmeyer era retirado da estufa e 1mL da suspensão bacteriana em seu conteúdo era diluído em série em salina peptonada 0,1% e, então, inoculado em placas de Petri com ágar MRS (MacFaddin, 1980). Também foi avaliado, nesses mesmos momentos, o pH (mPA-210, Piracicaba, SP, Brasil) dos caldos fermentados (Brasil, 2003). As contagens bacterianas foram feitas 48 horas após a inoculação de cada placa (Viegas *et al.*, 2010).

5.2.4. Produção de inóculo

O procedimento de produção de inóculos foi realizado três vezes, uma para cada repetição da produção de queijos. Foram feitos 250mL de cada inóculo por repetição. Ainda que eram utilizados apenas 200mL de cada micro-organismo por determinados tratamentos, assegurava-se um volume maior para evitar imprevistos.

5.2.4.1. *Mycobacterium bovis* BCG

Para que houvesse uma concentração final de 10^5 UFC/mL nos queijos submetidos à maturação, o inóculo inicial deveria apresentar uma contagem bacteriana mínima de 10^{10} UFC. Esse valor estima a perda do micro-organismo no processo de dessoramento entre 15 e 20% (Forgrave *et al.*, 2014), além de considerar o volume inicial de leite de cada tratamento, 16000mL.

A produção do inóculo foi feita a partir do resultado final da curva de crescimento. Como em cinco dias o micro-organismo atingiu contagem de 10^8 UFC/ml, o período de 120 horas ficou determinado como o padrão. O curto período de tempo também foi favorável para que *M. bovis* BCG ainda estivesse em fase de crescimento exponencial, o que facilitaria sua sobrevivência em situações extremas (Forgrave *et al.*, 2014; Forgrave *et al.*, 2016).

Dessa forma, cinco dias antes da produção de queijos de cada uma das três repetições, uma alíquota congelada de *M. bovis* BCG, do mesmo lote das utilizadas na curva de crescimento, era descongelada a 8°C por 60 minutos. Um volume de 500µL dessa amostra era adicionado em 50mL de caldo 7H9 com formulação idêntica à utilizada na curva: Middlebrook OADC a 10% (Difco), 0,5% de piruvato de sódio (Neon) e 0,05% de Tween 80 (Proquimios) (Allen, 1998; Robbe-Austerman *et al.*, 2013; Forgrave *et al.*, 2014). A inoculação ocorria em oito frascos de vidro com o meio de cultura. Assim, o volume total a ser adicionado no leite em cada um dos tratamentos A e B, 200mL, resultava em uma contagem do micro-organismo acima de 10^{10} UFC, suficiente para contaminar os queijos na concentração de 10^5 UFC/mL.

Evitaram-se sucessivas culturas de *M. bovis* BCG, utilizando, portanto, alíquotas previamente congeladas para a produção de inóculo em cada repetição. É sabido que passagens consecutivas do micro-organismo alteram sua capacidade de multiplicação, o que seria desfavorável para o experimento e o padrão definido pela curva de crescimento (Nascimento e Leite, 2004). Para

manter a homogeneidade do experimento, as alíquotas eram provenientes do mesmo lote daquelas utilizadas na construção da curva.

Ainda que a mensuração da densidade óptica possa ser realizada em suspensões bacterianas de *Mycobacterium*, alguns trabalhos afirmam que essa metodologia não é indicada para gênero. Isso porque há uma grande formação de grumos entre os bacilos, o que dificulta a leitura pelo equipamento. Portanto, foi utilizada como forma de acompanhamento a escala McFarland, mais indicada para curva de crescimento (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). O padrão utilizado foi o 8, uma vez que o padrão original de contagem, feito a partir de células de *Escherichia coli*, é diferente do de *Mycobacterium* (Zanini *et al.*, 1998).

Para confirmar a concentração do inóculo de *M. bovis* BCG, foi feita uma diluição em série até 10^{-9} em salina peptonada 0,1% e 100µL de cada diluição foi inoculada em ágar 7H11 (BD Difco), suplementado com Middlebrook OADC a 10% (Difco), 0,5% de piruvato de sódio (Neon) e 0,05% de Tween 80 (Proquimios) a 37°C por até dez dias para contagem de colônias (Forgrave *et al.*, 2014).

5.2.4.2. Bactérias ácido-láticas

Para que as inoculações de *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1 atingissem as concentrações determinadas de 10^8 UFC/mL nos queijos experimentais, os inóculos deveriam conter, cada, 10^{12} UFC.

Para tanto, 100µL de uma suspensão de cada bactéria com contagem conhecida foram inoculados separadamente em caldo MRS (Merck) por 24 horas a 37°C. Após esse período, 500µL de cada suspensão eram adicionados em cinco erlenmeyers contendo 50mL de caldo MRS (Merck) cada, incubados por 24 horas a 37°C. Assim, para a inoculação das BAL selecionadas no queijo experimental, a suspensão bacteriana deveria permanecer em crescimento no caldo MRS (Merck) por 16 horas, tempo determinado pela curva de crescimento de ambas as BAL até atingir as contagens definidas para o inóculo do queijo (McFaddin, 1980; Viegas *et al.*, 2010).

5.2.5. Análises microbiológicas de leite e soro-fermento

Foram pesquisados os seguintes micro-organismos nas três repetições de leite e soro-fermento:

5.2.5.1. *Mycobacterium bovis* BCG

A descontaminação e cultura para *M. bovis* BCG foram feitas de acordo com o item 5.2.5.1

5.2.5.2. Coliformes totais (a 30°C) e coliformes termotolerantes (a 45°C)

Alíquotas de 1mL de diluições seriadas das amostras foram inoculadas em Petrifilm (3M, Saint Paul, MI, EUA) e incubadas em aerobiose em estufa a 37°C por 24 horas (Ginn *et al.*, 1985).

5.2.5.3. Bactérias ácido-láticas

Alíquotas de 0,1mL de diluições seriadas das amostras foram inoculadas com a ajuda de alça de Drigalski em ágar MRS (Merck) e incubadas em aerobiose em estufa a 37°C por 48 horas (MacFaddin, 1980);

5.2.5.4. *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo

Alíquotas de 0,1mL de diluições seriadas das amostras foram inoculadas com a ajuda de alça de Drigalski em ágar Baird-Parker (BD Difco, Franklin Lakes, EUA) enriquecido com emulsão de

gema de ovo e telurito de potássio (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). As placas foram encubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento, determinou-se a concentração de *Staphylococcus* spp. pelo número de colônias contadas. As mesmas também foram classificadas em típicas ou atípicas. Em placas apenas com colônias de um só tipo, foram selecionadas cinco e inoculadas, cada uma, em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD Difco, Franklin Lakes, EUA). Naquelas placas em que os dois tipos de colônias apareciam, três de cada eram selecionadas e inoculadas também em caldo BHI (BD). Após 24 horas a 37°C, 500µL da suspensão eram adicionados lentamente, em tubo estéril, à mesma quantidade de plasma de coelho reconstituído (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Por fim, após incubação idêntica à da etapa anterior, era conferido se o conteúdo de cada tubo havia coagulado (Brasil, 2003).

5.2.5.5. Fungos

Alíquotas de 0,1mL de diluições das amostras foram inoculadas em ágar batata dextrose 2% (Acumedia, Lansing, MI, EUA), com a ajuda de alça de Drigalski. O ágar batata dextrose havia sido adicionado, previamente, de ácido tartárico (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) 10% estéril. As placas foram incubadas por sete dias a 25°C, não invertidas (Brasil, 2003).

5.2.5.6. *Salmonella* spp.

De cada amostra, 25mL foram adicionados em frascos contendo 225mL de salina peptonada tamponada 1% e homogeneizados. Após permanecerem em temperatura ambiente por uma hora, foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas para pré-enriquecimento. Em seguida, para enriquecimento seletivo, foram transferidos 1mL e 0,1mL das amostras para caldo Selenito Cistina (Himedia, Mumbai, Índia) e Rappaport Vassiliadis (Acumedia, Lansing, MI, EUA), respectivamente. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 41°C por 24 horas. Após esse período, para isolamento em meios sólidos seletivos, as amostras foram estriadas em ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) (Acumedia, Lansing, MI, EUA), ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Acumedia, Lansing, MI, EUA) e ágar Hektoen entérico (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 24 horas. De cada placa, oito colônias consideradas típicas foram inoculadas em meio ágar Rugai modificado (Pessoa e Silva, 1972) para realização dos testes bioquímicos. Aqueles tubos com leitura suspeita tiveram suas colônias selecionadas e incubadas em ágar nutriente (Acumedia, Lansing, MI, EUA) por 24 horas a 37°C. Por fim, após o lavado das colônias com salina peptonada 0,85%, essas foram submetidas ao teste de confirmação sorológica por meio do soro anti-*Salmonella* polivalente (Probac, São Paulo, SP, Brasil) (Brasil, 2003).

5.2.6. Análises físico-químicas, de contagem bacteriana total e de contagem de células somáticas de leite cru

As avaliações de contagem bacteriana total, contagem de células somáticas e composição do leite cru foram realizadas no LabUFMG. Para composição de leite, foram avaliados os teores percentuais de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado.

As amostras de leite em conservante azidiol foram avaliadas quanto à contagem bacteriana total pela metodologia de citometria de fluxo (Suhren e Walte, 2000) em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley..., 2002).

As amostras de leite em conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e natamicina) foram usadas para contagem de células somáticas em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley..., 1997), pelo método de citometria de fluxo (International..., 1995). A composição do leite, também obtida pelo equipamento Bentley CombiSystem 2300®, foi feita pelo método de absorção de comprimento de onda na região infravermelha (International..., 2000).

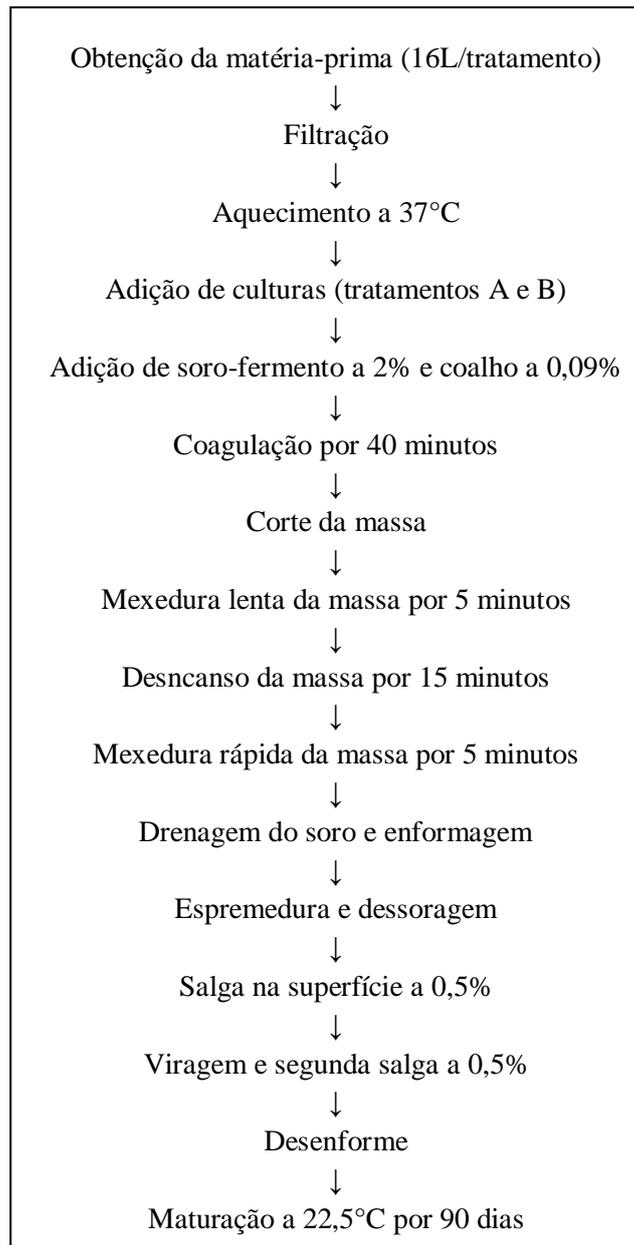
5.2.7. Produção de queijo tipo Minas artesanal

Os queijos foram feitos a partir de leite cru de vacas negativas para tuberculose coletado na Fazenda Campo Experimental Santa Rita, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Prudente de Moraes, MG. Soro-fermento (pingo) proveniente da Serra da Canastra foi adicionado em todos os tratamentos para mimetizar as condições tecnológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal, tendo sido coletado em propriedades rurais da mesma região produtora das BAL utilizadas no tratamento A. Ambas as matérias-primas foram recolhidas em três coletas distintas, de lotes diferentes, para que os queijos não fossem considerados réplicas. Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA EV-UFMG em acordo com a legislação vigente de produção de queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2011).

A produção dos queijos seguiu um fluxograma (figura 5.1) que mimetizava a produção de queijo Minas artesanal em fazendas cadastradas pelo IMA (Minas Gerais, 2011).

Para cada repetição, foram utilizados 48L de leite cru, sendo divididos em 16L por tratamento. Cada volume era vertido em um balde estéril de 20L, sendo filtrado por peneira estéril de nylon e plástico atóxico. O leite então era aquecido a 37°C com a ajuda de um ebulidor (Cherubino, Belo Horizonte, MG, Brasil) (figura 5.2), uma vez que chegava resfriado ao laboratório. Essa etapa não é tolerada na produção do queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2012), mas tornou-se necessária para permitir a coagulação do leite. A temperatura era verificada por um termômetro digital infravermelho (Incoterm, Porto Alegre, RS, Brasil).

Eram então adicionados os inóculos de acordo com o tratamento (figuras 5.3 e 5.4). Nos leites do tratamento A eram vertidos 200mL do inóculo de *M. bovis* BCG, 200mL do inóculo de *L. paracasei* B7 e mais 200mL do inóculo de *L. rhamnosus* D1. Nos leites do tratamento B, apenas 200mL do inóculo de *M. bovis* BCG eram adicionados. O leite permanecia em repouso por 15 minutos, quando então eram adicionados 320mL de soro-fermento da Canastra, volume semelhante ao utilizado pela produtora que o cedeu, e 15mL de coalho (Ha-La, Christian Hansen, Boege Alle, Dinamarca), seguindo as recomendações do fabricante (figuras 5.5 e 5.6).



Adaptado de Oliveira, 2014

Figura 5.1. Fluxograma de produção de queijo Minas artesanal



Figura 5.2. Aquecimento do leite cru com ebulidor até atingimento da temperatura de 37°C



Figuras 5.3 e 5.4. Inóculos de *L. paracasei* B7, *L. rhamnosus* D1 e *M. bovis* BCG

Era feita uma homogeneização rápida e suave com colher de polipropileno estéril, quando então a mistura repousava por 40 minutos. Após esse período, era verificado o ponto de corte da massa com uma faca de aço inox estéril. A massa era então cortada com auxílio de lira em aço inox (figura 5.7), também estéril, que permitia a formação de cubos de massa de queijo de tamanho 2cm x2cm x2cm. Seguia-se uma mexedura lenta por cinco minutos, repouso de 15 minutos, e uma mexedura rápida de 5 minutos, para expulsão do soro. Os coágulos eram então retirados com ajuda de uma peneira plástica e de uma colher de aço inox, ambas estéreis, e acondicionados em formas estéreis de polietileno, de fundo rendado, adequadas para 250g de produto. A prensagem dos queijos era realizada com a colher de aço inox e era seguida pela salga a 0,5% com cloreto de sódio refinado (figura 5.8). Após 24 horas, os queijos eram desenformados, virados, salgados novamente e pesados. A pesagem foi repetida ao longo da maturação, sendo realizada nos mesmos dias de análises microbiológicas e físico-químicas.



Figuras 5.5 e 5.6. Adição de soro-fermento e coalho no leite cru



Figuras 5.7 e 5.8. Corte da massa com lira em aço inox, recuperação e enformagem dos coágulos

Para os tratamentos A e B, os queijos foram produzidos em capela de fluxo laminar vertical. O tratamento C, controle, foi feito ao lado de bico de Bunsen para impedir a contaminação do produto.

5.2.8. Maturação de queijo tipo Minas artesanal

Os queijos foram maturados em duas estufas incubadoras B.O.D., a $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70% por até 90 dias. Os parâmetros foram baseados no histórico de 2016 para a região da Serra da Canastra (Instituto Nacional..., 2016), fonte de origem do pingo e das BAL utilizadas no experimento.

Uma estufa era reservada para os queijos controle e a outra, para os queijos dos tratamentos A e B. Nessa estufa, os queijos do tratamento B ficavam em prateleiras superiores aos do queijo A, para evitar a contaminação de BAL inoculadas durante a produção (figura 5.9). Nos primeiros dias, quando ainda havia dessoramento, uma bandeja era colocada na grade abaixo dos queijos, para recolher o soro. Essa bandeja era revestida por saco plástico identificado como “lixo infectante”, que era descartado corretamente após ser retirado da B.O.D. A cada repetição, os queijos mais maduros eram colocados em prateleiras acima dos frescos para evitar contaminações posteriores à produção.



Figura 5.9. Maturação de queijos tipo Minas artesanal em B.O.D

5.2.9. Análises microbiológicas e físico-químicas de soro de queijo e queijo tipo Minas artesanal

5.2.9.1. Análise de *M. bovis* BCG

Soro de queijo e queijo Minas artesanal de todas as repetições e de todos os tratamentos foram analisados quanto à presença e contagem de *M. bovis* BCG. Soro de queijo e queijo dos tratamentos C deveriam ser negativos quanto a esse micro-organismo.

5.2.9.1.1. Descontaminação

Não existe meio seletivo para o crescimento de micro-organismos do gênero *Mycobacterium* (Allen, 1998). Os meios utilizados são ricos em nutrientes, uma vez que essas espécies necessitam de tempo e aporte nutricional para crescerem. Como são fastidiosas, micobactérias estão em desvantagem quando em competição com outros micro-organismos em diferentes meios de cultura (Forgrave *et al.*, 2014). Portanto, foi necessário descontaminar as amostras para eliminar a microbiota competidora e, assim, permitir o crescimento de micobactérias (Rowe e Donaghy, 2008).

A descontaminação, entretanto, pode diminuir a capacidade de recuperação das micobactérias. Isso porque os compostos utilizados nessa etapa podem, ainda que de maneira atenuada, ser

citotóxicos para esses micro-organismos (Klanicova *et al.*, 2012; Hafinian, 2014). Dentre as metodologias descritas na literatura, aquela que apresentava menor impacto sobre as contagens de micobactérias após a descontaminação foi escolhida. O método consiste na utilização de cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) em uma concentração de 0,75% por cinco horas (Corner *et al.*, 1998; Ambrosio *et al.*, 2008; Klanicova *et al.*, 2012; Hafinian, 2014).

Para a descontaminação de queijo, 25g do produto eram pesados e acondicionados de forma asséptica em um saco de *stomacher* com 225mL de salina peptonada 0,1%. O conteúdo era homogeneizado por 120 segundos em homogeneizador de amostras de tipo *stomacher* (SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil) e então permanecia em banho-maria a 37°C para liquefação da amostra. Após esse período, 30mL da amostra eram transferidos para tubo falcon estéril (figura 5.10) e centrifugados por 15 minutos a 2500g. O sobrenadante era descartado com cuidado para que a porção superior de gordura continuasse no tubo. O conteúdo amostral era então ressuspenso em 10mL de salina peptonada e 0,075g de HPC (Inlab, São Paulo, SP, Brasil). O tubo permanecia em local ao abrigo de luz por cinco horas, para que ocorresse a descontaminação. O tubo falcon era novamente centrifugado por 15 minutos a 2500g, o sobrenadante era descartado e o pellet restante era ressuspenso novamente em 10mL de salina peptonada 0,1% (Donaghy *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2014; Michel *et al.*, 2015).

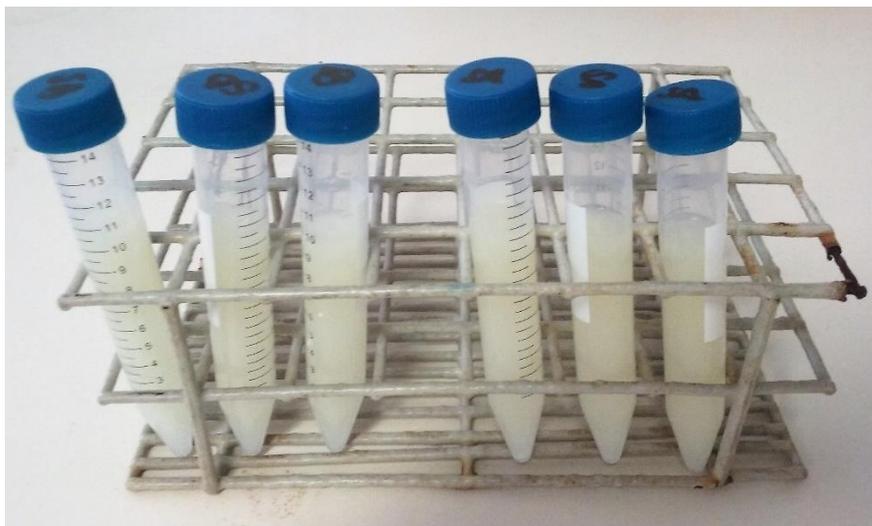


Figura 5.10. Descontaminação das amostras de queijos por HPC em tubo Falcon estéril

A mesma metodologia foi aplicada às amostras líquidas. Entretanto, as mesmas não obedeciam a etapa de liquefação, visto a natureza desses materiais.

5.2.9.1.2. Cultura

Após descontaminação, as amostras provenientes de queijo e de soro de queijo dos tratamentos A e B eram diluídas em série em salina peptonada 0,1% e 100µL eram inoculados em ágar 7H11 sem verde malaquita (BD Difco), suplementado com Middlebrook OADC a 10% (Difco), 0,5% de piruvato de sódio (Neon), 0,05% de Tween 80 (Proquimios), 0,5% de sangue de carneiro lisado e desfibrinado e 10% de soro fetal bovino estéril (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) (Forgrave *et al.*, 2014). As amostras provenientes de leite, de soro-fermento e do tratamento C não sofriam diluição, sendo plaqueadas no volume de 100 µL diretamente no ágar 7H11 com a mesma composição descrita. As placas eram revestidas por Parafilm (Bemis) e mantidas em estufa a 37°C por até dez dias em aerobiose para contagem de colônias (Forgrave *et al.*, 2016; Macuamule *et*

al., 2016). Foram consideradas colônias positivas aquelas eugônicas, não cromatogênicas, de coloração creme, com bordas irregulares e superfície granular (Rocha, 2013) (figura 5.11).

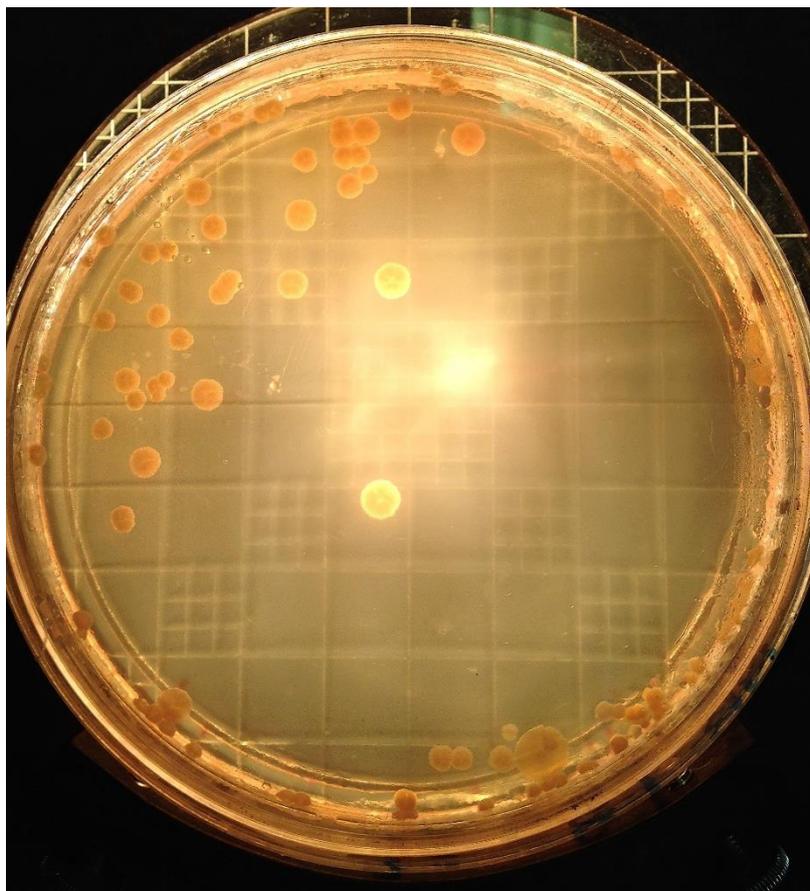


Figura 5.11. Colônias de *M. bovis* BCG sobre ágar 7H11

A partir dos resultados da cultura de *M. bovis* BCG, foram feitas as curvas de sobrevivência do micro-organismo em queijo tipo Minas artesanal, assim como calculado o Valor $D_{22^{\circ}\text{C}}$ (Forgrave *et al.*, 2014).

5.2.9.1.3. Coloração de Ziehl-Neelsen

Para confirmar a identidade de *M. bovis* BCG em ágar 7H11 como álcool-ácido resistentes, foi aplicada a coloração de Ziehl-Neelsen nas colônias crescidas nesse meio e que não se enquadrava, no padrão determinado no item 5.1.9.1.2 (OIE, 2008).

5.2.9.2. Análise de BAL, coliformes a 30°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, fungos e *Salmonella* spp

As análises de BAL (MacFaddin, 1980), coliformes a 30°C e a 45°C (Ginn *et al.*, 1985) e *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, fungos e *Salmonella* spp. (Brasil, 2003) foram feitas conforme o item 5.1.5.

5.2.9.3. Análises físico-químicas de queijo tipo Minas artesanal

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas I do DTIPOA EV-UFGM. As amostras de queijo foram submetidas às seguintes análises físico-químicas: extrato seco total e umidade pelo método gravimétrico, gordura pelo método de Gerber,

extrato seco desengordurado, acidez titulável, pH, proteínas pelo método de Kjeldahl, cloretos pelo método argentométrico e resíduo mineral fixo. Todas foram feitas de acordo com Brasil (2006). Todas as análises físico-químicas de queijo Minas artesanal foram feitas em triplicata.

5.2.10. Descarte de material contaminado

Todo o material utilizado durante a produção de queijos e análise das amostras foi autoclavado a 121°C por 30 minutos. O soro de queijo dos três tratamentos, após autoclavagem, foi encaminhado para descarte apropriado, de acordo com orientação da Gerência Ambiental e de Biossegurança da EV-UFMG.

5.2.11. Análise estatística

Os resultados foram testados quanto à sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Como não foi atingida a distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos para comparação de medianas.

As medianas dos tratamentos A, B e C foram avaliadas entre si pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por comparação entre medianas pelo pós-teste de Dunn. Essas provas foram feitas para contagens de *M. bovis* BCG e contagens de BAL.

Também foi feita a comparação por regressão linear das duas curvas dos tratamentos A e B para *M. bovis* BCG e BAL. Para que houvesse essa análise, foi feita transformação das contagens para log₁₀, seguida pela análise de variância (ANOVA) a aplicação do teste F.

A relação entre o tempo de maturação e a contagem de *M. bovis* BCG, dentro de cada tratamento, também foi analisada pela regressão linear, seguida pelo teste F. Também foi feita transformação das contagens para log₁₀ e ANOVA.

O coeficiente de correlação foi calculado para demonstrar a correlação entre contagem de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B e as variáveis microbiológicas e físico-químicas dos queijos, tendo sido aplicado o coeficiente de Spearman nas comparações.

Para todas as análises, foi considerado um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prism 6.01. Os gráficos foram construídos pelo programa Microsoft Office Excel 2016.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Curva de crescimento

As curvas de crescimento apontaram o tempo necessário para a produção dos inóculos a serem utilizados na produção de queijos.

A curva de crescimento de *M. bovis* BCG (figura 5.12), feita em sete dias, indicou que, em cinco dias, o micro-organismo atinge a concentração de 10⁸ UFC/mL, necessária para ser utilizado como inóculo dos queijos. Tempo semelhante de crescimento foi visto em trabalhos que também realizaram a curva para utilização posterior de *M. bovis* BCG (Nde *et al.*, 2011; Macuamule *et al.*, 2016).

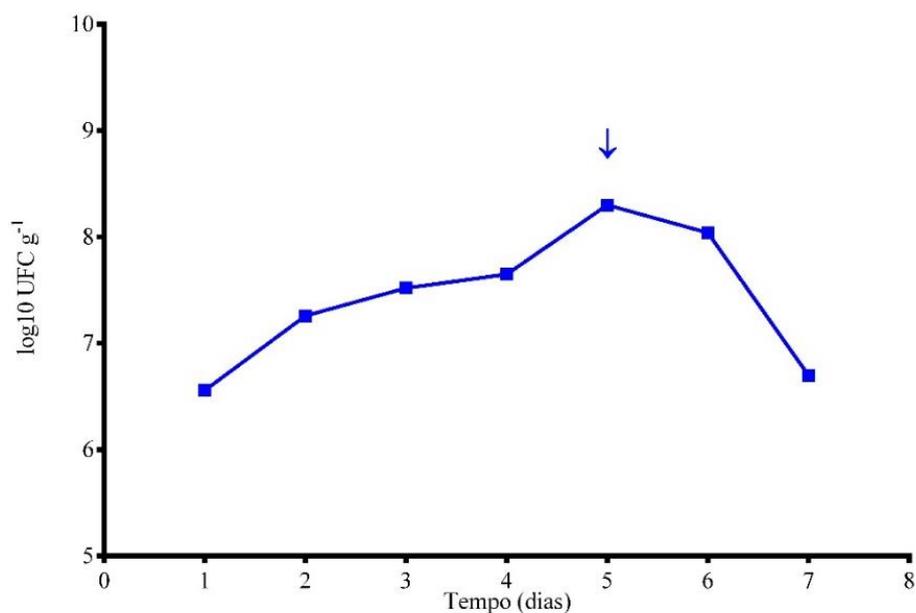


Figura 5.12. Curva de crescimento com contagem média (log₁₀ UFC g⁻¹) de *M. bovis* BCG por sete dias em caldo 7H9

M. bovis BCG apresenta crescimento fastidioso por conta de sua parede celular espessa, rica em ácidos micólicos, que retarda a entrada de nutrientes para o interior da bactéria (Tortora *et al.*, 2012). Por ser uma amostra de origem controlada e em caldo, seu crescimento é mais acelerado quando comparado com amostras selvagens (Organização..., 2009).

As curvas de crescimento (figuras 5.13 e 5.14) de *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1 foram semelhantes e atingiram seu ápice, 10⁹ UFC/mL, em 16 horas.

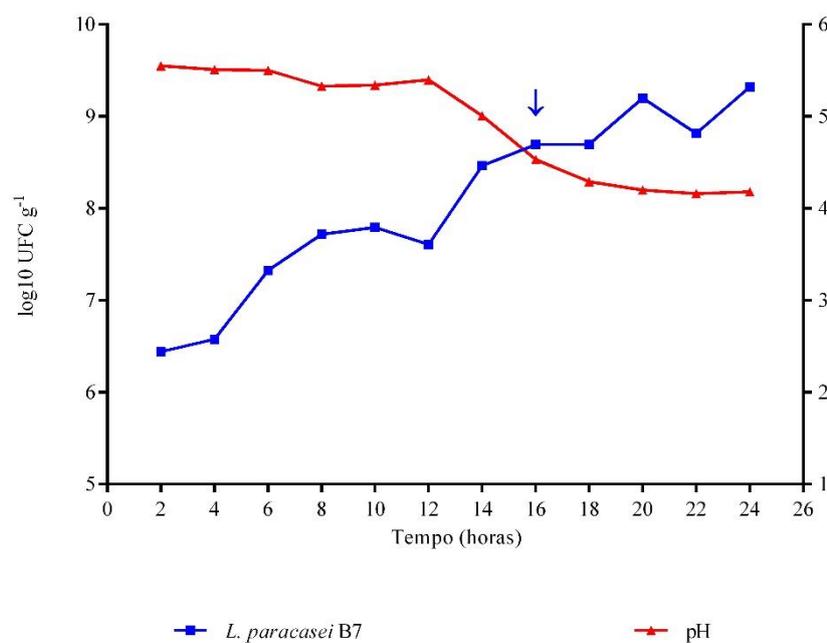


Figura 5.13. Curva de crescimento com contagem de *L. paracasei* B7 e pH por 24 horas em caldo MRS

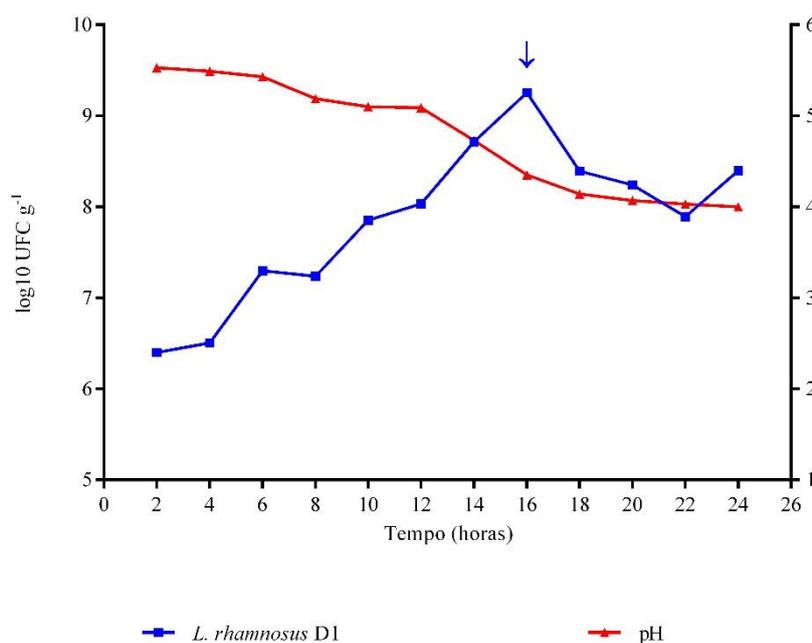


Figura 5.14. Curva de crescimento com contagem de *L. rhamnosus* D1 e pH por 24 horas em caldo MRS

5.3.2. Produção de inóculo

De acordo com as curvas de crescimento (item 5.2.1), o inóculo de *M. bovis* BCG deveria permanecer por 120 horas (cinco dias) em caldo 7H9 (BD) a 37°C para atingir a concentração adequada. Os inóculos de ambas as BAL deveriam permanecer também a 37°C por 16 horas. As concentrações médias dos inóculos nas produções de queijo encontram-se na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Concentração média de inóculos bacterianos para produção de queijo tipo Minas artesanal (UFC/mL), coeficiente de variação (%), intervalo de confiança (95%) (UFC/mL) e quantidade total adicionada no leite (UFC),

Micro-organismo	Concentração (UFC/mL)	CV (%)	IC (95%) (UFC/mL)	Adição no leite (UFC)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	$4,5 \times 10^8$	4,46	$2 \times 10^8 - 1,2 \times 10^9$	9×10^{10}
<i>L. paracasei</i> B7	3×10^{10}	1,58	$1,9 \times 10^{10} - 4 \times 10^{10}$	6×10^{12}
<i>L. rhamnosus</i> D1	$1,9 \times 10^{10}$	2,29	$1 \times 10^{10} - 3 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{12}$

5.3.3. Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru e microbiológica de soro-fermento

Os resultados da qualidade microbiológica e físico-química de leite cru e microbiológica de soro-fermento encontram-se nas tabelas 5.2 e 5.3.

Tabela 5.2. Valores médios microbiológicos e físico-químicos de leite cru e parâmetros estabelecidos pelas Leis nº19.492 de 2011 e nº 20.549 de 2012 e pelos Decretos 42645 de 2002 e 44.864 de 2008, coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/mL)

Parâmetro	Leite cru			Legislação
		CV (%)	IC (95%)	
<i>M. bovis</i>	Ausência	-	-	-
Coliformes totais (UFC/mL)	1,5x10 ³	115	6,4x10 ² – 5,8x10 ³	-
Coliformes termotolerantes (UFC/mL)	6	173	0 – 2x10 ¹	≤ 100
BAL (UFC/mL)	3,1x10 ⁴	133	2,8x10 ³ – 2,5x10 ⁵	-
<i>Staphylococcus spp.</i> (UFC/mL)	1,4x10 ⁴	74	8,2x10 ³ – 3,2x10 ⁴	-
<i>Staphylococcus coagulase positivo</i> (UFC/mL)	3,7x10 ²	173	0 – 1,1x10 ³	≤ 100
Fungos (UFC/mL)	1,4x10 ²	89	0 – 2,4x10 ²	-
<i>Salmonella spp.</i> em 25mL	Ausência	-	-	Ausência
CCS (cél./mL)	6,8x10 ⁵	2	6,6x10 ⁵ – 6,9x10 ⁵	≤ 4x10 ⁵
CBT (UFC/mL)	3,4x10 ⁵	120	1,5x10 ⁵ – 1,3x10 ⁶	≤ 1x10 ⁵
Gordura (g/100g)	4,09	2	4 – 4,14	> 3
Proteína (g/100g)	3,55	0,5	3,54 – 3,57	> 2,9
Lactose (g/100g)	4,21	0,1	4,2 – 4,2	> 4,3
EST (g/100g)	12,87	0,5	12,8 – 12,92	> 11,5
ESD (g/100g)	8,78	0,1	8,77 – 8,8	> 8,5

A qualidade microbiológica de leite cru esteve fora do padrão estabelecido pela legislação estadual apenas no quesito *Staphylococcus coagulase positivo*. Esse micro-organismo é originário principalmente de vacas com mastite (Freitas *et al.*, 2013) e já foi relacionado a diversos casos de toxi-infecção alimentar no estado (Veras *et al.*, 2008). A mastite subclínica dos animais também altera os níveis normais de contagens de célula somática e bacteriana total, que também estavam fora do padrão determinado pela lei (Minas Gerais, 2008; Minas Gerais, 2009, Minas Gerais, 2012). É frequente a ocorrência de leite cru para produção de queijo Minas artesanal fora dos padrões legais, como atestam diversos trabalhos na área, tanto de propriedades cadastradas quanto não cadastradas (Oliveira, 2014; Silva, 2015; Castro *et al.*, 2016).

As culturas para *M. bovis* foram negativas em todas as amostras de leite. Tais resultados eram esperados, visto que o leite era proveniente de fazenda com rebanho negativo para a doença. Entretanto, relatos recentes têm identificado *M. bovis* e outras micobactérias em leite cru tanto no Brasil quanto no exterior. No país, diversos estudos demonstraram a presença do patógeno em leite cru de diversas regiões: sudeste (Pardo *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2013),

sul (Sgarioni *et al.*, 2014), centro-oeste (Leite *et al.*, 2003) e nordeste (Ramos *et al.*, 2016). É interessante salientar que todas as regiões apresentam situações distintas de desenvolvimento agropecuário e de prevalência da doença em bovinos. Ainda assim, o patógeno persiste nos rebanhos do país.

Tabela 5.3. Resultados médios de análises microbiológicas de soro-fermento coletado em propriedade cadastrada pelo IMA na Serra da Canastra para produção de queijo tipo Minas artesanal (UFC/mL), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/mL)

Parâmetro	Soro-fermento		
		CV (%)	IC (95%)
<i>M. bovis</i>	Ausência	-	-
Coliformes totais	7×10^1	160	$0 - 2 \times 10^2$
Coliformes termotolerantes	$< 1,5 \times 10^1$	-	-
BAL	$5,5 \times 10^5$	92	$4,6 \times 10^4 - 2,5 \times 10^6$
<i>Staphylococcus spp.</i>	2×10^6	113	$4 \times 10^5 - 9 \times 10^6$
<i>Staphylococcus coagulase</i> positivo	$< 2,5 \times 10^1$	-	-
Fungos	9×10^4	89	$3,3 \times 10^4 - 1,8 \times 10^5$
<i>Salmonella spp.</i>	Ausência	-	-

Não há parâmetro legal para as análises microbiológicas de soro-fermento. Entretanto, tomando como base o mesmo padrão do leite cru, perceberam-se baixas contagens de micro-organismos não desejáveis. Apenas *Staphylococcus spp.* esteve em contagens elevadas. Esse micro-organismo não é considerado como relevante para a legislação, uma vez que esta só reporta padrões para *Staphylococcus coagulase* positivo. Entretanto, *Staphylococcus coagulase* negativo também é capaz de produzir toxinas e já esteve envolvido em surto alimentares pelo consumo de produtos derivados do leite em Minas Gerais (Veras *et al.*, 2008). A contagem de BAL foi considerada satisfatória e estava em concordância com resultados encontrados em pesquisas de soro-fermento de queijo Minas artesanal (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016; Silva, 2016). A presença desses micro-organismos em soro-fermento é indispensável, visto que essa matéria-prima é a fonte principal de BAL para queijos Minas artesanal (Lima *et al.*, 2009; Brumano, 2016).

Também não foi verificada a presença de *M. bovis* nos fermentos analisados. Tais resultados eram esperados, pois o soro-fermento foi fornecido por uma fazenda cadastrada produtora de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra. Para uma queijaria ser cadastrada pelo IMA, é obrigatória a comprovação de rebanho livre de tuberculose (Minas Gerais, 2012). Como o soro-fermento é oriundo da produção de queijo, um rebanho livre da doença garante a ausência do patógeno no pingo. Não existem relatos na literatura consultada sobre a presença desse patógeno em soro-fermento. Entretanto, visto a capacidade desse patógeno em sobreviver em ambientes com altas concentrações de sal como o soro-fermento (Donaghy *et al.*, 2004; Hanifian, 2014), caso uma propriedade seja considerada positiva para a doença, o pingo utilizado por ela e que possa estar contaminado deve ser descartado.

5.3.4. Contagem de *M. bovis* BCG em soro de queijo

Os soros de queijo, provenientes da produção dos queijos dos tratamentos A, B e C, foram analisados quanto à contagem de *M. bovis* BCG (tabela 5.4). A análise foi feita para determinar a perda desse micro-organismo durante a produção dos queijos tipo Minas artesanal.

Tabela 5.4. Contagem média de *M. bovis* BCG em soro de queijo após produção de queijo tipo Minas artesanal, coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/mL)

Tratamento	Concentração (UFC/mL)	CV (%)	IC (95%) (UFC/mL)
A	$2,8 \times 10^4$	6,89	$2,5 \times 10^4 - 2,8 \times 10^4$
B	$5,4 \times 10^4$	36,71	$2,5 \times 10^4 - 5,4 \times 10^4$
C	Ausente	-	-

Considerando uma contagem inicial de *M. bovis* BCG $4,5 \times 10^8$ UFC/mL, a eliminação do micro-organismo pelo soro de queijo não alterou sua concentração final desejada no queijo. Isso pode ser comprovado pela contagem de *M. bovis* BCG nos queijos de um dia dos tratamentos A e B (tabelas 5.5 e 5.6), que atingiram os valores médios de 2×10^5 UFC/g e $2,5 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que o processo de produção de queijo tipo Minas artesanal não contribuiu para a inativação de *M. bovis* BCG.

A mesma perda foi vista em trabalho que investigava a persistência de *M. bovis* em queijos Cheddar e Caerphilly. Nesse experimento, duas amostras distintas do patógeno foram perdidas em concentrações de 2×10^2 UFC/mL a 2×10^4 UFC/mL pelo soro do queijo. A eliminação também não afetou a concentração final de *M. bovis* nos queijos estudados (Forgrave *et al.*, 2014).

Ainda que ocorra a perda desses micro-organismos no soro, é provável que a afinidade de *M. bovis* pela parte lipídica do leite (Millar *et al.*, 1996) permita que *M. bovis* BCG permaneça em maiores concentrações no queijo. Isso porque a massa formada a partir da coagulação do leite é constituída principalmente das proteínas e dos lipídios, facilitando essa concentração (Fox *et al.*, 2004).

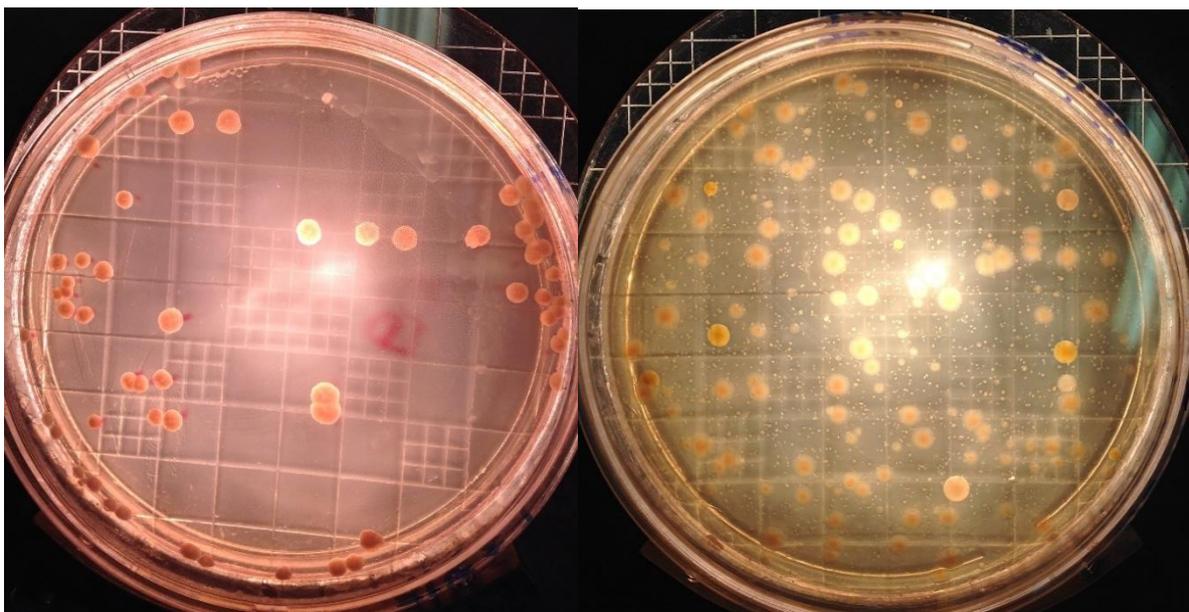
É importante transferir a recuperação de *M. bovis* BCG em soro de queijo para um ambiente real de produção de queijo Minas artesanal. A legislação estadual permite que esse soro seja utilizado para alimentação animal (Minas Gerais, 2002). Assim, sabendo da promiscuidade de *M. bovis* em atingir diversas espécies de mamíferos de forma patogênica, deve-se considerar o risco de um rebanho doente, mesmo de forma indireta, contaminar outros animais em uma mesma propriedade. Essa situação geraria um ciclo em que, mesmo após a eliminação de vacas doentes, a doença permaneceria endêmica naquela propriedade.

5.3.5. Condições de cultivo de *M. bovis* BCG isolados de queijo tipo Minas artesanal

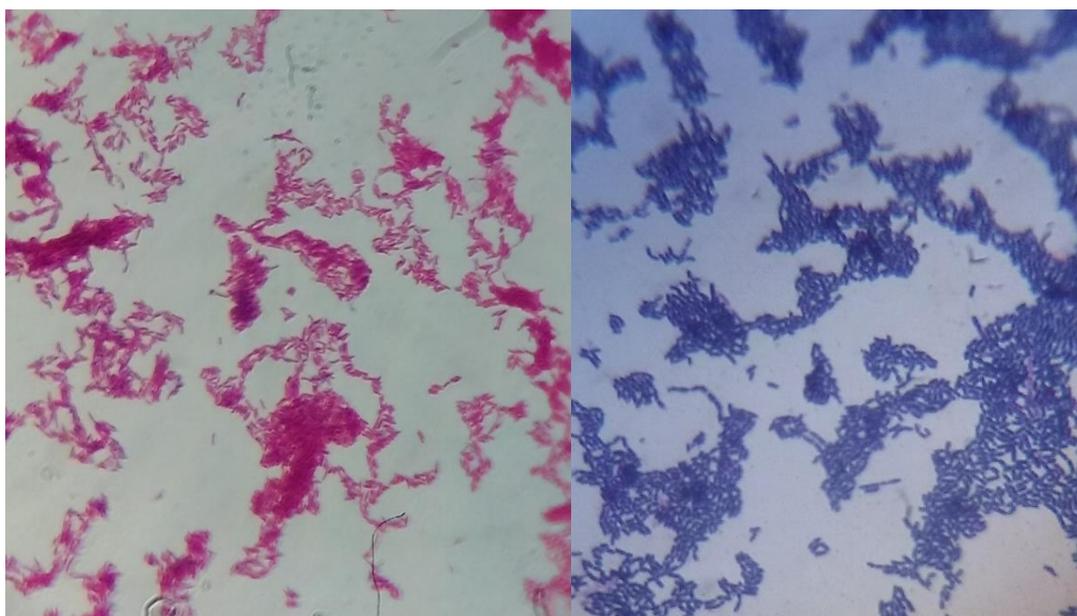
A cultura de *M. bovis* BCG e outras micobactérias a partir de matrizes com microbiota competidora é desafiadora (Grant *et al.*, 2001). Ainda que o método de descontaminação HPC a 0,75% tenha sido utilizado nesse experimento, algumas placas de 7H11 permitiram o crescimento de micro-organismos competidores (figuras 5.15 e 5.16). O mesmo problema já foi relatado em trabalhos que utilizaram a mesma metodologia de descontaminação (Sung e Collins, 2000; Moriconi, 2013), ou metodologias distintas, como a aplicação de antimicrobianos no ágar (Spahr

e Schafroth, 2001; Forgrave *et al.*, 2014). A contagem de *M. bovis* BCG também pode ter sido minimamente subestimada, visto que o HPC é também citotóxico para essa micobactéria (Klanicova *et al.*, 2012; Hanifian, 2014).

Entretanto, mesmo em situações de contaminação, a diferenciação das colônias indesejáveis das de *M. bovis* BCG foi possível, tanto pelo seu aspecto macroscópico quanto pela coloração de Ziehl-Neelsen em microscópio (figuras 5.17 e 5.18). A mesma conclusão foi vista em um trabalho que isolou MAP de queijos suíços (Spahr e Schafroth, 2001). De qualquer forma, a cultura de micobactérias ainda é o padrão ouro para análise de espécimes clínicos (Forgrave *et al.*, 2014). O limite mínimo de enumeração de *M. bovis* BCG pela técnica utilizada foi de 16 UFC/g.



Figuras 5.15 e 5.16. Comparação entre colônias típicas de *M. bovis* BCG (esquerda) e microorganismos contaminantes (direita) em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C



Figuras 5.17 e 5.18. Comparação entre coloração de Ziehl-Neelsen (esquerda) e Gram (direita) das colônias crescidas em ágar 7H11 após descontaminação e incubação por 10 dias a 37°C

5.3.6. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo tipo Minas artesanal

As contagens médias de *M. bovis* BCG e BAL dos tratamentos A, B e C, em queijo tipo Minas artesanal, ao longo da maturação de 90 dias estão descritas nas tabelas 5.5 a 5.7.

Tabela 5.5. Enumeração média de *M. bovis* BCG e BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento A ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

Tratamento A						
	<i>M. bovis</i> BCG			BAL		
	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)
1	2,8x10 ⁵	86%	6,3x10 ⁴ – 5,4x10 ⁵	7,6x10 ⁸	82%	8,7x10 ⁷ – 1,3x10 ⁹
8	7,3x10 ⁴	32%	5x10 ⁴ – 9x10 ⁴	9,3x10 ⁸	48%	5x10 ⁸ – 1,3x10 ⁹
15	2,7x10 ⁴	56%	1,2x10 ⁴ – 4,2x10 ⁴	4x10 ⁹	142%	4,8x10 ⁸ – 1x10 ¹⁰
22	6,6x10 ³	83%	6x10 ² – 1,1x10 ⁴	5,4x10 ⁸	70%	1,3x10 ⁸ – 8,9x10 ⁸
29	4,3x10 ²	74%	2x10 ² – 8x10 ²	6x10 ⁷	64%	2x10 ⁷ – 9,7x10 ⁷
45	Ausência	-	-	9x10 ⁶	131%	1,8x10 ⁶ – 2,5x10 ⁷
60	Ausência	-	-	7,1x10 ⁴	80%	5,3x10 ³ – 1x10 ⁵
90	Ausência	-	-	3x10 ²	173%	0 – 9x10 ²
CV	188%	-	-	137%	-	-

É crucial apontar que queijos adicionados de soro-fermento e BAL (tratamento A) não apresentaram *M. bovis* BCG aos 45 dias de maturação (tabela 5.5). Os queijos do tratamento B, entretanto, deixaram de apresentar cultura positiva para o micro-organismo apenas após o 60º dia de maturação (tabela 5.6). A alta concentração de BAL pode ter favorecido a eliminação mais rápida de *M. bovis* BCG nos queijos do tratamento A. A presença em concentrações elevadas de BAL pode permitir tanto a acidificação maior do meio, pois esses micro-organismos são capazes de produzir ácido láctico e outros ácidos orgânicos, como também de sintetizar bacteriocinas. Esses peptídeos são reconhecidamente antimicrobianos e já foram testados com sucesso contra micobactérias tanto *in vitro* (tabela 3.7) como em leites fermentados (Macuamule *et al.*, 2016).

Os coeficientes de variação encontrados tanto na tabela anterior quanto nas seguintes estão de acordo com aqueles registrados na literatura. A contagem de micro-organismos é uma variável muito instável, acima de 30%, enquanto que os parâmetros físico-químicos permanecem em porcentagens inferiores (Sampaio, 2010).

Tabela 5.6. Enumeração média de *M. bovis* BCG e BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento B ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

Tratamento B						
	<i>M. bovis</i> BCG			BAL		
	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)
1	2,9x10 ⁵	54%	1,1x10 ⁵ – 4,1x10 ⁵	5,2x10 ⁵	88%	6,8x10 ⁴ – 9,9x10 ⁵
8	5,4x10 ⁴	45%	3x10 ⁴ – 7,9x10 ⁴	6,7x10 ⁶	106%	8x10 ⁵ – 1,4x10 ⁷
15	3,4x10 ⁴	39%	2x10 ⁴ – 4,7x10 ⁴	1,7x10 ⁷	127%	3,3x10 ⁶ – 4,3x10 ⁷
22	5x10 ³	63%	2,6x10 ³ – 8,6x10 ³	2,4x10 ⁷	81%	1,2x10 ⁷ – 4,6x10 ⁷
29	1x10 ³	5%	1x10 ³ – 1,1x10 ³	2,3x10 ⁷	125%	5,7x10 ⁶ – 5,7x10 ⁷
45	6	171%	0 – 2x10 ²	2,1x10 ⁷	147%	8,1x10 ⁵ – 5,7x10 ⁷
60	Ausência	-	-	2,4x10 ⁴	74%	5,3x10 ³ – 4,1x10 ⁴
90	Ausência	-	-	Ausência	-	-
CV	204%	-	-	108%	-	-

A viabilidade de *M. bovis* e MAP ao longo da maturação de queijos artesanais tem sido estudada com mais afinco desde o início do século XXI (capítulo I, item 3.3.10). Os trabalhos consultados indicaram diversos períodos mínimos de inativação, que variaram de acordo com o tempo e as condições de maturação (tabela 5.8). Também foram fatores que influenciaram a viabilidade o tipo de leite usado e se ele sofreu tratamento térmico, e também se houve adição de fermentos lácteos.

Tabela 5.7. Enumeração média de BAL (UFC/g), coeficiente de variação (%) e intervalo de confiança (95%) (UFC/g) em queijos tipo Minas artesanal do tratamento C ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

Tratamento C			
	BAL		
	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)
1	1,7x10 ⁶	151%	5,9x10 ⁵ – 1,3x10 ⁷
8	1,3x10 ⁷	107%	4,3x10 ⁶ – 4,7x10 ⁷
15	9,6x10 ⁶	96%	9,2x10 ⁵ – 4,4x10 ⁷
22	2,2x10 ⁶	127%	5,9x10 ⁵ – 1x10 ⁷
29	7,3x10 ⁶	63%	4x10 ⁶ – 1,4x10 ⁷
45	7,8x10 ⁵	97%	3x10 ⁴ – 5,5x10 ⁶
60	5x10 ⁴	61%	3,1x10 ⁴ – 9,6x10 ⁴
90	Ausência	-	-
CV	117%	-	-

Todos os períodos apresentados pelos trabalhos descritos na tabela 5.8 foram superiores àqueles vistos nesse trabalho. As diferenças entre os períodos e suas causas entre os diversos trabalhos podem ser vistos nos itens 5.2.9 e 5.2.10, que tratam das características microbiológicas e físico-químicas desses queijos e dos queijos tipo Minas artesanal.

É importante também fazer um contraponto entre o tempo mínimo encontrado no presente trabalho e os tempos mínimos de maturação permitidos pela legislação estadual para as regiões produtoras de queijo Minas artesanal: 14 dias em Araxá, 17 dias no Serro e 22 dias para as outras regiões (Minas Gerais, 2013; Minas Gerais, 2017). O tempo previsto para eliminação de *M. bovis* BCG foi muito superior àquele aceito legalmente para liberar o produto para consumo. Deve-se considerar ainda que o tempo mínimo de 45 dias foi atingido apenas com a concentração de BAL em contagens superiores a 10⁹ UFC/g (tratamento A), dificilmente conseguida em queijo Minas artesanal original. Assim, a importância de se produzir o queijo Minas artesanal a partir de matérias primas adequadas do ponto de vista microbiológico e com boas práticas de fabricação se torna evidente e que não se deve garantir a segurança do produto apenas pela maturação.

Quanto ao valor D_{22°C} para *M. bovis* BCG, os tratamentos com esse micro-organismo apresentaram resultados semelhantes. No tratamento A, foram necessários 14,32 dias para eliminação de 90% da carga da micobactéria; no tratamento B, o tempo foi de 14,45 dias. Em comparação aos outros trabalhos (tabela 5.8), o valor D_{22°C} visto em queijo tipo Minas artesanal foi bastante inferior. Isso pode indicar condições mais adversas nesses queijos, tanto no início quanto ao longo da maturação para a sobrevivência da micobactéria. Dentre essas condições, pode-se citar a temperatura de maturação elevada (22°C), a carga microbiana competitiva decorrente da utilização de leite cru e soro-fermento, o pH e a acidez do produto e a umidade da câmara de maturação.

Tabela 5.8. Viabilidade de *M. bovis* e MAP em queijos experimentais ao longo da maturação

Trabalho	Micobactéria	Queijo	Temperatura de maturação	Adição de BAL	Tempo D _{1°C} (dias)	Inativação total
Sung e Collins, 2000	MAP	Queso fresco	4°C	Sim	7,9 a 59,9	> 30 dias
Spahr e Schafroth, 2001; Spahr e Schafroth, 2002	MAP	Emmentaler e Tilsiter	12°C a 22°C	Sim	27,8 e 45,5	> 120 dias
Donaghy <i>et al.</i> , 2003; Donaghy <i>et al.</i> , 2004	MAP	Cheddar	10°C	Sim	96 a 107	> 27 semanas
Cirone <i>et al.</i> , 2006	MAP	Queijo de cabra	20°C	Sim	-	> 60 dias
Hanifian, 2014a	MAP	Fresco ultra-filtrado	8°C	Sim	-	> 60 dias
Hanifian, 2014b	MAP	Lighvan	-	-	-	> 6 meses
Forgrave <i>et al.</i> , 2014; Forgrave <i>et al.</i> , 2016	<i>M. bovis</i>	Cheddar	12°C	Sim	41 a 57	393 dias
Forgrave <i>et al.</i> , 2014; Forgrave <i>et al.</i> , 2016	<i>M. bovis</i>	Caerphilly	12°C	Sim	24 a 59	145 dias
Starikoff <i>et al.</i> , 2016	<i>M. bovis</i>	Tipo Parmesão	18°C	Sim	37	> 60 dias

Duas amostras distintas de MAP em queijo branco tipo Hispânico exibiram valores D semelhantes aos encontrados com *M. bovis* BCG no presente trabalho. As condições de maturação (20°C) e de pH (entre 4 e 5) foram bastante semelhantes àquelas vistas nos queijos tipo Minas artesanal (tabela 5.11). Assim, os tempos para redução de um log da carga bacteriana variaram de 7,9 a 19,7 dias. O mesmo trabalho estudou MAP sensibilizado por calor, e esses micro-organismos foram ainda mais sensíveis, com valores D_{20°C} tão baixos quanto 1,3 dia. Valor D de MAP também foi testado em queijo armazenado a 4°C e, nessas condições, houve uma redução de um log apenas após 59,9 dias (Sung e Collins, 2000).

Os valores D desses dois trabalhos, entretanto, são muito inferiores quando comparados a outros estudos com micobactérias em queijo. Em trabalho com *M. bovis* em queijos cheddar e caerphilly, os valores D variaram de 24 a 73 dias, dependendo da concentração de inóculo presente. É importante, entretanto, salientar que tais queijos foram maturados a uma temperatura de 12°C e embalados a vácuo. Essas condições permitem uma condição melhor de sobrevivência do micro-organismo, porque não há perda de umidade, e as reações microbiológicas, como produção de ácido e bacteriocinas por BAL, ocorrem em uma velocidade mais baixa (Forgrave *et al.*; 2016).

O mesmo patógeno foi estudado em queijo tipo parmesão e o valor D encontrado foi de 37 dias. A temperatura de maturação, 18°C, pode ter influenciado esse período maior que o do atual trabalho. Entretanto, a maior diferença nesse trabalho foi o uso de leite pasteurizado para a produção do queijo tipo parmesão. Assim, não havia uma carga microbiana elevada, que competia com a micobactéria pelos nutrientes do queijo, nem talvez uma concentração elevada de ácidos orgânicos e bacteriocinas para antagonizar *M. bovis* (Starikoff *et al.*, 2016).

Outro trabalho com MAP e queijos suíços Emmentaler e Tisliter, determinaram-se valores D de 27,8 e 45,5 dias, respectivamente. A temperatura de maturação desses queijos foi de 12°C e, aliada a pH acima de 5, resultou em uma lenta redução na concentração do patógeno bovino (Spahr e Schafroth, 2001).

É interessante contrapor a sobrevivência e, principalmente, o valor D de *M. bovis* e MAP dos valores D dos outros micro-organismos encontrados no presente trabalho. Os coliformes a 30°C e a 45°C apresentaram valor $D_{20^{\circ}\text{C}}$ de 6,2 e 6 dias, respectivamente. *Staphylococcus* coagulase positivo teve valor $D_{20^{\circ}\text{C}}$ de 4,3 dias. Essa diferença ocorre, pois as micobactérias, também conhecidas como bacilos álcool-ácido resistentes, apresentam sobrevivência superior em ambientes inóspitos (Rowe e Donaghy, 2008). Tal característica de resiliência se deve sobretudo à composição de sua parede celular, que possui uma camada espessa de ácidos micólicos, que protege a célula (Caroll *et al.*, 2010). Apenas *Staphylococcus* spp. apresentou valor D acima do de *M. bovis* BCG, de 43,3 dias. Isso se deve principalmente à sua capacidade em se manter viável em ambientes com alta concentração de sal (Jeong *et al.*, 2017), com relatos de sobrevivência de até oito meses em queijos (Aponte *et al.*, 2008).

5.3.7. Comparação tratamentos A, B e C para viabilidade de *M. bovis* BCG ao longo da maturação em queijo tipo Minas artesanal

As curvas das contagens de *M. bovis* BCG dos tratamentos A (adição de inóculos de *M. bovis* BCG e BAL), B (adição de inóculo *M. bovis* BCG) e C (controle) e BAL dos tratamentos A, B e C estão presentes nas figuras 5.19 e 5.20, respectivamente.

Ainda que o tratamento A tenha apresentado um tempo menor de eliminação de *M. bovis* BCG, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as curvas dos tratamentos A e B quanto à inativação da micobactéria. Essa semelhança pode ser explicada pela similaridade dos padrões microbiológicos (exceto pelas contagens de BAL) e físico-químicos ao longo dos 90 dias de maturação. Resultado semelhante ao do presente estudo foi encontrado em uma pesquisa iraniana com queijo ultrafiltrado, em que queijos com e sem adição de cultura starter industrializada também não apresentaram diferença na eliminação de MAP ao longo de 30 dias de maturação (Hanifian, 2014a).

A quantidade de *M. bovis* BCG presente nos tratamentos A e B nos primeiros quinze dias de maturação esteve acima de 10^4 UFC/g. Nessa concentração, o queijo tipo Minas artesanal poderia ter sido um perigo para a tuberculose zoonótica. Isso porque um consumo de 100g de produto elevaria *M. bovis* BCG a contagens de 10^6 UFC, dose considerada como infectante pela rota gastrointestinal (Advisory..., 2017). Ainda que a concentração de *M. bovis* BCG no ensaio possa ter sido próxima à máxima relatada para excreção de *M. bovis* em leite, 5×10^5 UFC/mL (Kells e Lear, 1960; Zanini *et al.*, 1998), percebe-se o risco da infecção pelo patógeno em situações reais.

M. bovis BCG

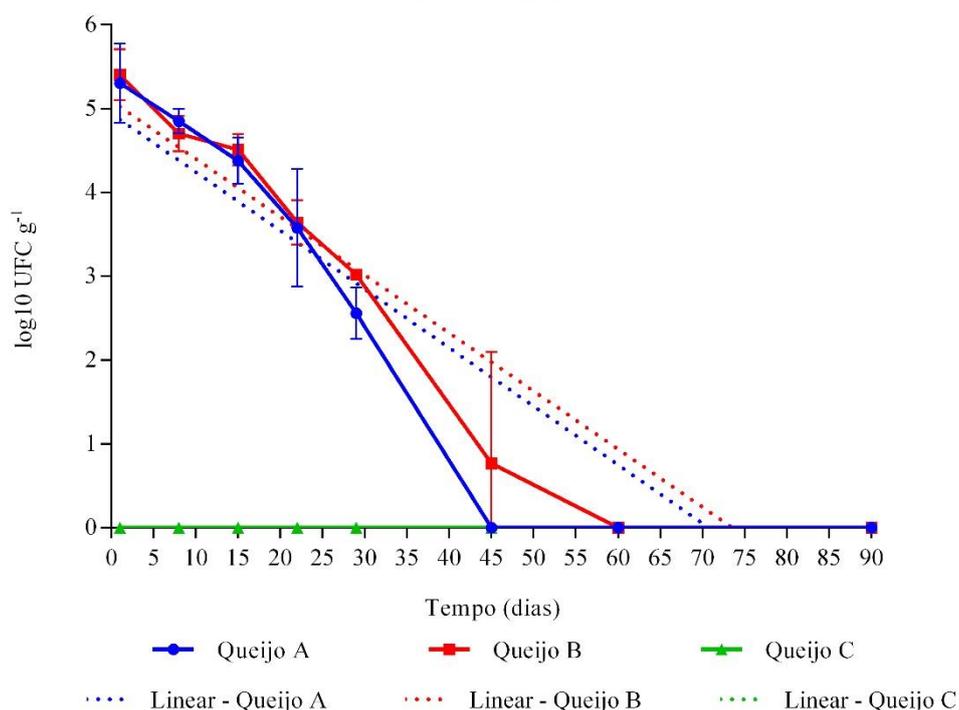


Figura 5.19. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG nos tratamentos A, B e C de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias; ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = N/A$. Barras de erro indicam desvio padrão.

É importante notar também que, durante as primeiras três semanas de maturação, as contagens de *M. bovis* BCG permaneceram altas e semelhantes nos dois tratamentos. Alguns autores consideram esse período inicial como crucial para a mortalidade de diversos patógenos, visto que há uma acelerada redução no pH, um aumento rápido nas contagens de BAL e na produção de substâncias antagonistas (Hanifian, 2014a). No caso das micobactérias, entretanto, os argumentos dessa resistência é que esses micro-organismos passaram a sofrer com as condições do ambiente somente após esse período inicial. Dentre essas condições poderiam estar a concentração de cloretos, a umidade dos queijos, a acidez e o pH e a competição por nutrientes provocada pela presença de outros micro-organismos. É sabido que, além da parede celular extremamente resistente, esses micro-organismos são capazes de entrar em um estado vegetativo quando frente a situações de estresse ambiental, o que também pode ter acontecido nessa circunstância (Lamont *et al.*, 2012). O mesmo resultado foi visto em trabalhos que avaliaram a sobrevivência de *M. bovis* e MAP ao longo da maturação de queijos (Spahr e Schafroth, 2001; Klaniva *et al.*, 2012; Hanifian, 2014a).

M. bovis BCG, entretanto, não sobreviveu as primeiras 60 horas em kefir. Todavia, o pH desse produto atingiu valores de 3,9, muito abaixo daqueles vistos nos trabalhos com queijo (Macuamule *et al.*, 2016). MAP termicamente sensibilizado também apresentou menor viabilidade em início de maturação de queijo Cheddar, o que pode ocorrer em queijos de massa cozida (Spahr e Schafroth, 2001; Sung e Collins, 2001). Como o queijo Minas artesanal é produzido a partir de massa crua, sem aquecimento (Brasil, 1996; Minas Gerais, 2012), essa sensibilização não poderia acontecer em situação não experimental.

A similaridade dos tratamentos pode ser visualmente confirmada na figura 5.19, em que as curvas de sobrevivência de *M. bovis* BCG nos tratamentos A e B praticamente se sobrepõem. Ainda que as contagens de *M. bovis* BCG permaneceram altas no primeiro mês, as condições de maturação do queijo Minas artesanal foram responsáveis pela diminuição de 90% (valor D) da carga bacteriana em apenas 14 dias (item 5.2.6).

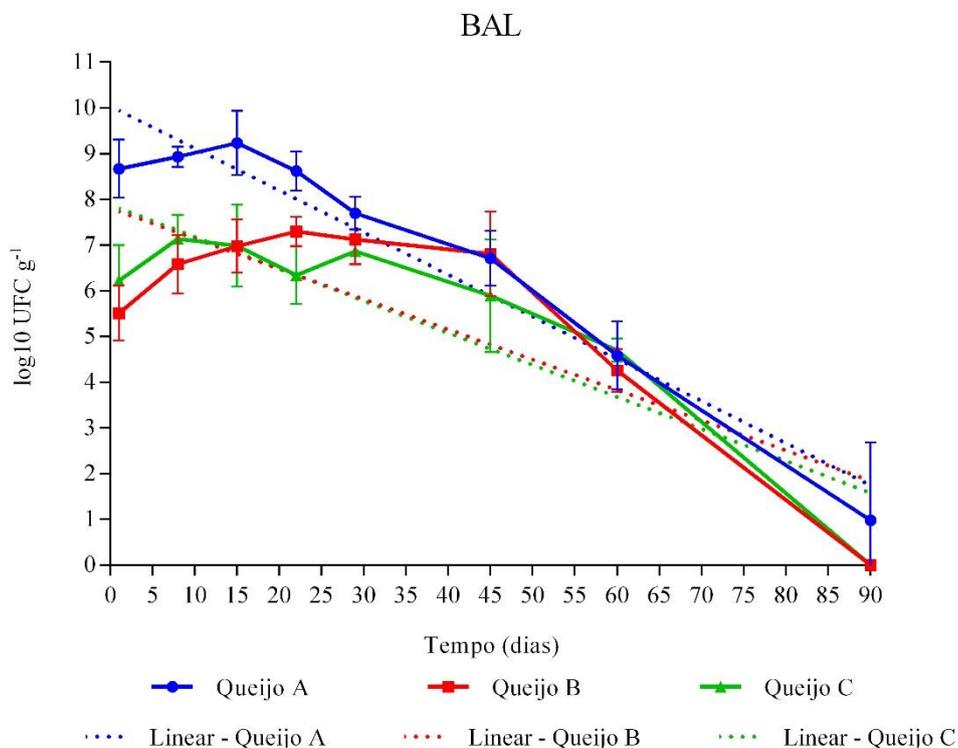


Figura 5.20. Variação na contagem média de BAL nos tratamentos A, B e C de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias; ● $R^2 = 0,94$, ■ $R^2 = 0,64$, ▲ $R^2 = 0,78$. Barras de erro indicam desvio padrão.

As médias das contagens de BAL foram diferentes ($P < 0,05$) entre o tratamento A contra os tratamentos B e C. Os tratamentos B e C, entretanto, apresentaram medianas equivalentes ($P > 0,05$). Isso já era esperado visto que, no tratamento A, houve adição de 10^{12} UFC de *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1. Os tratamentos B e C foram idênticos no ponto de vista tecnológico, pois receberam BAL apenas do pingo e do leite cru. É interessante também notar que as contagens de BAL do tratamento A tornaram-se semelhantes às dos outros dois tratamentos a partir do 29º dia de maturação. A diminuição mais acelerada nas contagens das BAL no tratamento A, em que houve adição de *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1, pode estar relacionada à inabilidade de esses dois micro-organismos sobreviverem em queijo a longo prazo. Aquelas BAL presentes originalmente no leite e no soro-fermento podem estar mais adaptadas às situações extremas da produção de queijo, como baixo pH, alta concentração de sais e redução constante na concentração de umidade.

Ainda assim, ao 90º dia de maturação, BAL dos tratamentos B e C não estavam mais viáveis. Entretanto, houve contagem de $9,6 \times 10$ UFC/g de BAL no tratamento A, o que indica que maiores concentrações desses micro-organismos na inoculação permitem sua sobrevivência por um maior tempo. Os benefícios de BAL também podem estar presentes mesmo após sua inativação. Isso

porque os ácidos orgânicos e as bacteriocinas sintetizadas por elas permanecem atuando na matriz do queijo (Carroll *et al.*, 2010).

5.3.8. Sobrevivência de *M. bovis* BCG e viabilidade de BAL ao longo da maturação nos tratamentos A, B e C

A evolução das contagens de *M. bovis* BCG e BAL ao longo da maturação nos queijos A, B e C pode ser observada nas figuras 5.21, 5.22 e 5.23, respectivamente.

A maturação provocou a eliminação de *M. bovis* BCG em 45 dias no tratamento A, com adição de *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1. A tendência da curva indicou que houve diferença ($P < 0,0001$) na contagem da micobactéria ao longo do período de maturação.

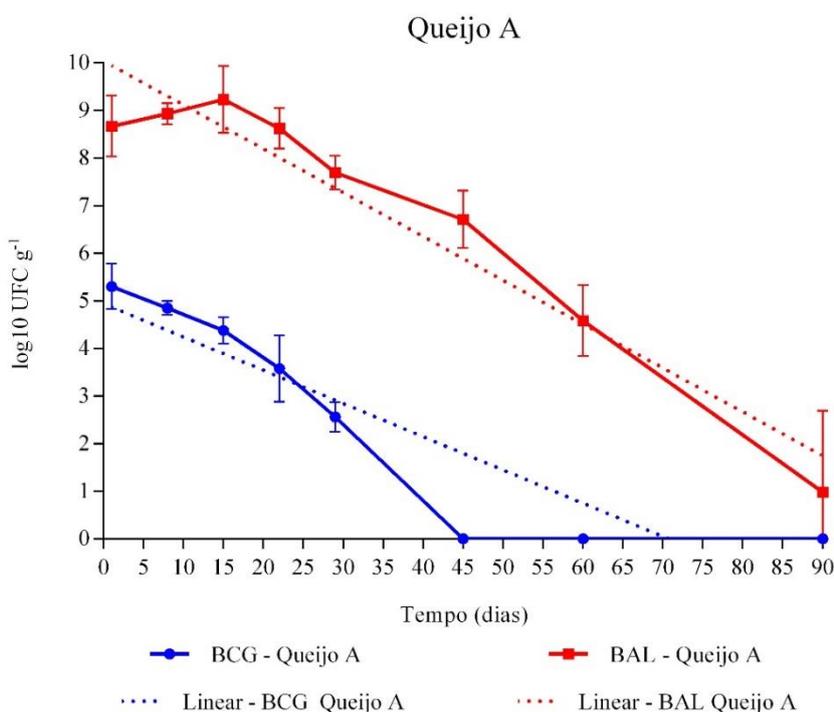


Figura 5.21. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG e BAL (tratamento A) em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,94$. Barras de erro indicam desvio padrão.

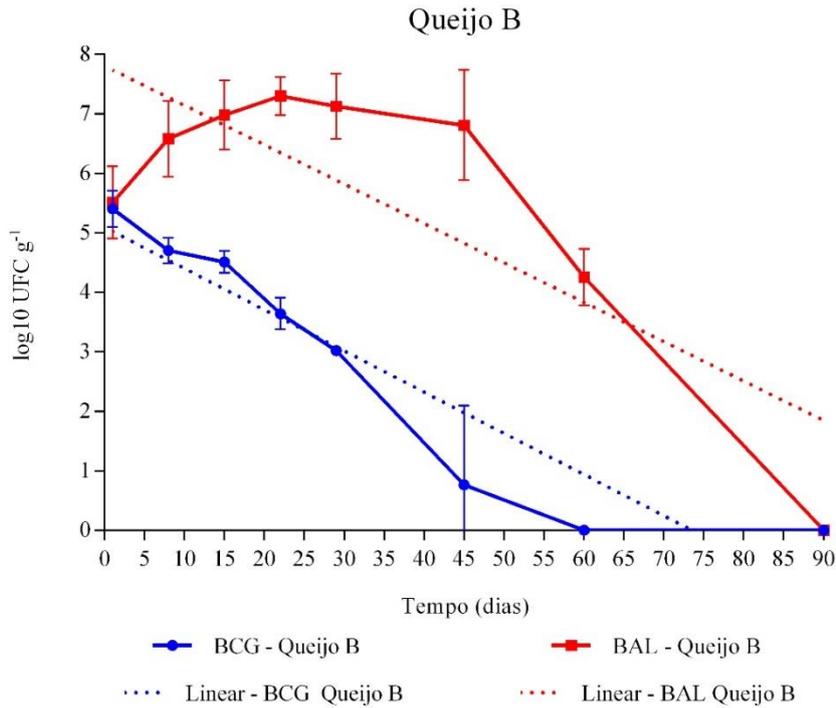


Figura 5.22. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG e BAL (tratamento B) em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,88$, ■ $R^2 = 0,64$. Barras de erro indicam desvio padrão.

No tratamento B, a eliminação de *M. bovis* BCG ao longo de 90 dias, de acordo com a tendência da curva, foi significativa ($P < 0,0001$).

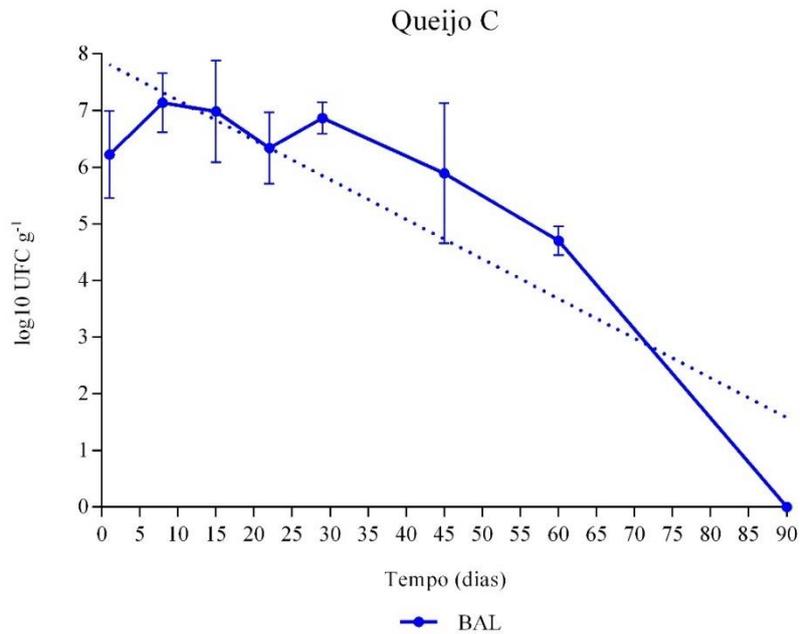


Figura 5.23. Variação na contagem média de BAL (tratamento C) em queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias; ● $R^2 = 0,78$. Barras de erro indicam desvio padrão.

A correlação de Spearman entre as contagens de BAL, que chegaram a contagens acima de 10^9 UFC/g, e de *M. bovis* BCG para o tratamento A foi significativa ($P = 0,0083$) e apresentou um valor positivo de 0,8783. Essa correlação pode ser interpretada como um fator decisivo a uma eliminação mais rápida da micobactéria, como visto no item 5.2.7. A adição de cultura *starter* também estava correlacionada ($P < 0,05$) a uma redução mais acelerada na viabilidade de MAP em iogurte (Van Brandt *et al.*, 2011) e em queijos ultrafiltrados, principalmente após 30 dias de incubação (Hanifian, 2014a), e na viabilidade de *M. bovis* em queijo Caerphilly (Forgrave *et al.*, 2016). A contagem de BAL, entretanto, não foi correlacionada ($P > 0,05$) com a diminuição da micobactéria no tratamento B. A correlação de Spearman entre as contagens de BAL e de *M. bovis* BCG para o tratamento B, entretanto, não foi significativa ($P = 0,4317$), com um valor de 0,3234, considerado fraco pela literatura (Sampaio, 2010). Assim, a contagem desses micro-organismos, que chegou a 1×10^7 UFC/g nesses queijos, não comprometeu a sobrevivência de *M. bovis* BCG ao longo da maturação.

De tal modo, pode-se mais uma vez constatar que a adição de BAL na produção de queijo tipo Minas artesanal favoreceu diretamente a eliminação de *M. bovis* BCG. É sabido que esses micro-organismos são capazes de acidificar o meio onde se encontram, e, sobretudo, de produzir bacteriocinas, que agem como antimicrobianos. BAL em altas concentrações são responsáveis pela produção de bacteriocinas em maior quantidade (Chung *et al.*, 2000). Assim concentrações de 10^9 UFC/g produzem mais desses peptídeos. Em conjunto com as bacteriocinas, o pH externo também pode potencializar a inativação de *M. bovis* BCG. Isso porque o modo principal de ação das bacteriocinas é a formação de poros na membrana plasmática. Um ambiente externo com alta concentração de ácidos, aliado aos poros na membrana, permite um abaixamento no pH interno das micobactérias, acelerando e intensificando a morte desses micro-organismos (Gaggia *et al.*, 2010).

Assim, o fator concentração de BAL pode ter sido o principal diferencial entre os dois tratamentos e a sobrevivência de *M. bovis* BCG. Ainda que os exemplares *L. paracasei* B7 e *L. rhamnosus* D1 não tenham sido estudados quanto à síntese de bacteriocinas, essas duas espécies de BAL adicionadas no tratamento A já foram, em outros estudos, descritas como produtoras de bacteriocinas com ação contra micobactérias (Todorov *et al.*, 2008; Van Brandt *et al.*, 2011; Macuamule *et al.*, 2016).

5.3.9. Correlação entre parâmetros microbiológicos e contagem de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B ao longo da maturação de queijo tipo Minas artesanal

Os valores médios das contagens dos micro-organismos indesejáveis em queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias estão apresentados na tabela 5.9.

Ao longo da maturação, as condições do meio nos queijos produzidos se alteraram consideravelmente. O ambiente se tornou ácido, com baixa umidade, alta concentração de sal e metabólitos de diversos micro-organismos, além da diminuição da disponibilidade nutricional. A competição entre micro-organismos presentes em queijos elaborados com leite cru é maior, pois o leite possui com uma microbiota diversa e em grandes concentrações, como pode ser observado na tabela 5.9.

Frente a esses desafios, ocorreu uma diminuição na viabilidade dos micro-organismos presentes nos queijos tipo Minas artesanal. Trabalhos que estudaram a maturação de queijo Minas artesanal

Tabela 5.9. Parâmetros microbiológicos médios (UFC/g), coeficientes de variação (%) e intervalos de confiança (95%) (UFC/g) de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

	Coliformes 30°C			Coliformes 45°C			<i>Staphylococcus</i> spp.			<i>Staphylococcus coagulase</i> positivo			Fungos		
	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/g)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)	Contagem (UFC/mL)	CV (%)	IC (95%) (UFC/g)
1	4,3x10 ⁴	91	3,7x10 ³ – 8,2x10 ⁴	6,4x10 ³	87	2x10 ² – 1,1x10 ⁴	1,2x10 ⁶	65	7,2x10 ⁵ – 2,1x10 ⁶	2,5x10 ³	134	0 – 3x10 ⁵	1,5x10 ⁴	131	2,5x10 ³ – 3,8x10 ⁴
8	7x10 ²	102	1,4x10 ² – 1,5x10 ³	5x10 ¹	98	0 – 1x10 ²	1,3x10 ⁷	81	1,2x10 ⁶ – 2,2x10 ⁷	7,6x10 ¹	173	0 – 4,4x10 ⁵	1,7x10 ⁶	46	9x10 ⁵ – 2,5x10 ⁶
15	5,3x10 ²	173	10 ⁰ – 1,6x10 ³	3,3x10 ¹	168	0 – 1x10 ²	2,8x10 ⁶	35	2x10 ⁶ – 4x10 ⁶	3,9x10 ¹	173	0 – 6x10 ⁴	1,2x10 ⁶	89	2,5x10 ⁵ – 2,5x10 ⁶
22	7	74	10 ⁰ - 10	-	-	-	8,1x10 ⁶	169	8,9x10 ⁵ – 2,3x10 ⁷	-	-	-	2,6x10 ⁶	100	8,4x10 ⁵ – 5,6x10 ⁶
29	-	-	-	-	-	-	6,8x10 ⁶	86	1,5x10 ⁵ – 1,1x10 ⁷	-	-	-	1,9x10 ⁶	67	5,5x10 ⁵ – 3,2x10 ⁶
45	-	-	-	-	-	-	1x10 ⁷	116	4,4x10 ⁵ – 2,5-10 ⁷	-	-	-	1,4x10 ⁵	80	1,8x10 ⁴ – 2,5x10 ⁵
60	-	-	-	-	-	-	8,4x10 ⁶	171	3,8x10 ⁴ – 2,5x10 ⁷	-	-	-	1,7x10 ⁵	152	1x10 ⁴ – 4,9x10 ⁵
90	-	-	-	-	-	-	5x10 ⁵	173	2x10 ² – 1,5x10 ⁶	-	-	-	-	-	-

indicaram resultados semelhantes (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016). A viabilidade de coliformes a 30°C e a 45°C e de *Staphylococcus* coagulase positivo diminuíram consideravelmente durante esse período, enquanto que *Staphylococcus* spp. permaneceu viável até o 90º dia de maturação. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse micro-organismo é halófilo e consegue sobreviver mesmo em condições extremas de baixa umidade e alta concentração de sal (Jay, 2005). Os outros micro-organismos, mais sensíveis a essas condições, ao pH e à presença de BAL, são inativados mais rapidamente. Os fungos também conseguiram sobreviver ao longo da maturação, pois se encontravam na superfície externa de queijos, onde conseguem se manter viáveis mesmo em condições inóspitas (Fox *et al.*, 2000).

Como esperado, os coeficientes de variação para contagens de cada micro-organismo e tempo de maturação permaneceram altos. Já é consenso que contagens microbiológicas são bastante instáveis e apresentam valores acima de 30% (Sampaio, 2010). A correlação entre as contagens de *M. bovis* BCG nos tratamentos A e B e os parâmetros microbiológicos de queijo tipo Minas artesanal se encontram na tabela 5.10.

Tabela 5.10. Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros microbiológicos médios de amostras de queijo Minas artesanal durante 90 dias de maturação a 22°C e as contagens médias de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B

		Tratamento A	Tratamento B
Coliforme 30°C	Coeficiente	0,9618	0,9442
	P	0,0012*	0,0012*
Coliforme 45°C	Coeficiente	0,8944	0,8781
	P	0,0060*	0,0060*
<i>Staphylococcus</i> spp.	Coeficiente	0,4148	0,5389
	P	0,3125	0,1765
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	Coeficiente	0,8944	0,8781
	P	0,0060*	0,0060*
Fungos	Coeficiente	0,3172	0,3593
	P	0,4491	0,3786

* Correlação significativa (P < 0,05)

A microbiota de BAL de queijos feitos de leite cru, como o queijo tipo Minas artesanal do presente trabalho, pode afetar de forma significativa a viabilidade de patógenos, tanto pela capacidade de antagonizar esses micro-organismos quanto pela competição por nutrientes. A partir desse pressuposto, as correlações entre esses micro-organismos e *M. bovis* BCG estão nas figuras 5.24 a 5.27.

As curvas de sobrevivência de coliformes a 30°C e a 45°C quando compradas às de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B se encontram nas figuras 5.24 e 5.25.

Em ambos os tratamentos, houve uma correlação positiva e significativa (P < 0,05) entre as contagens de coliformes a 30°C e a 45°C e a contagem de *M. bovis* BCG (tabela 5.10). Assim, houve redução na viabilidade de todos esses micro-organismos ao longo da maturação.

É sabido que coliformes são capazes de produzir ácidos orgânicos como o CO₂ em ambientes com presença de lactose. Há, assim, uma redução de valores de pH, que pode afetar a tanto a presença de *M. bovis* BCG quanto a dos próprios coliformes. Entretanto, como o valor de pH dos queijos

tipo Minas artesanal não estava correlacionado à viabilidade de *M. bovis* BCG, deve-se pressupor que essa correlação tenha se dado de forma independente.

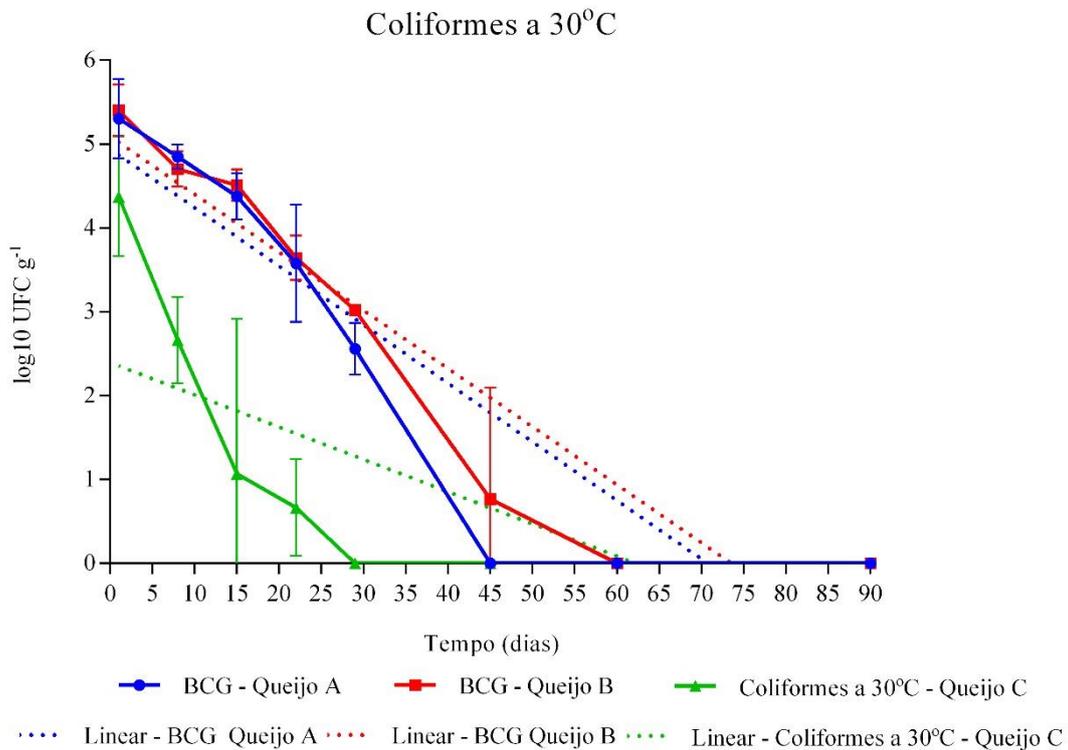


Figura 5.24. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e coliformes a 30°C em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,58$. Barras de erro indicam desvio padrão.

É possível, portanto, que tenha ocorrido uma relação indireta entre *M. bovis* BCG e coliformes a 30°C e a 45°C e a matriz onde estavam inseridos. É possível perceber pelas curvas que todos foram incapazes de sobreviver a longo prazo no queijo. Essas características podem estar relacionadas às condições determinadas pela diminuição de umidade, pelo aumento de cloretos, pela depleção de nutrientes e, provavelmente, pela presença de bacteriocinas sintetizadas por BAL.

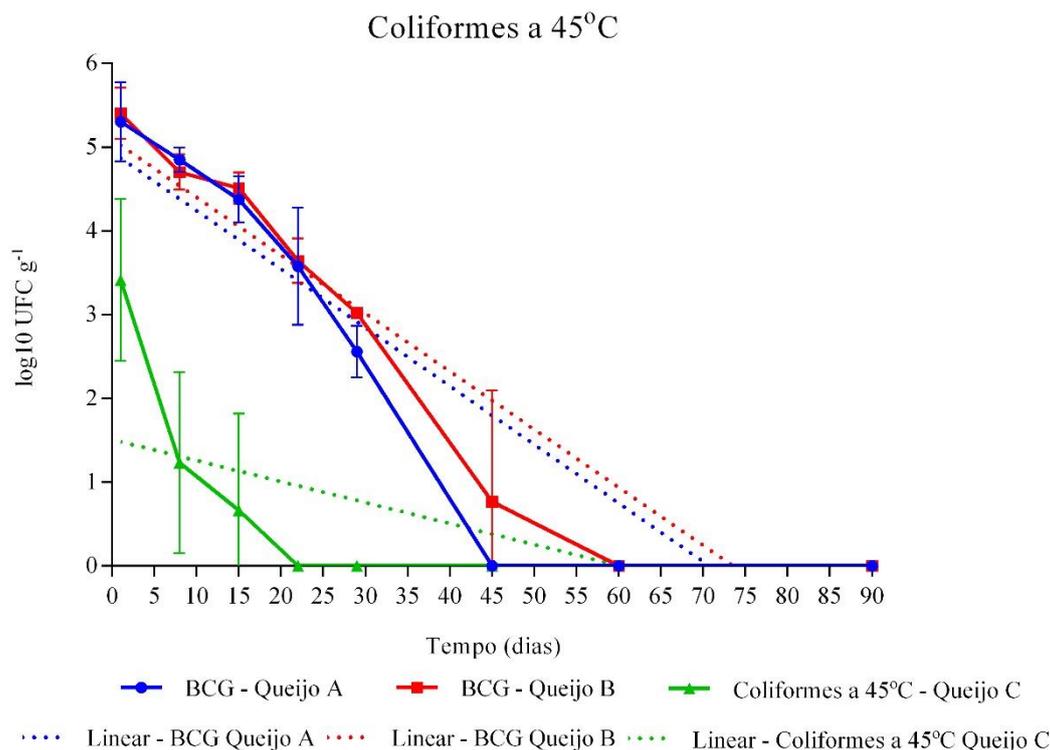


Figura 5.25. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e coliformes a 45°C em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● R² = 0,82, ■ R² = 0,88, ▲ R² = 0,46. Barras de erro indicam desvio padrão.

Mesmo não havendo relatos na correlação entre micobactérias e coliformes em queijos, ambos os micro-organismos são, com frequência, associados à contaminação de águas. Nesses ambientes, há uma correlação positiva com a manutenção desses micro-organismos em altas concentrações, principalmente porque as condições da água permitem replicação ou persistência de ambos. Ainda assim, em experimento *in vitro*, micobactérias ambientais apresentaram período maior de resistência frente a condições adversas como pH e cloração quando comparadas aos coliformes (Bland *et al.*, 2005). O mesmo resultado pode ser visto no presente trabalho, pois os coliformes atingiram contagens mínimas antes dos 30 dias de maturação, enquanto que *M. bovis* BCG permaneceu viável entre 30 e 45 dias após a produção dos queijos tipo Minas artesanal. Entretanto, em situações extremas, como aquelas vistas nos queijos tipo Minas artesanal após 45 dias de maturação, nenhum desses micro-organismos sobreviveu. Condições extremas também foram vistas em fermentação de silagem de milho e fermentação de esterco, em que micobactérias e coliformes a 45°C sobreviveram por um curto período de tempo. Mais uma vez, os coliformes foram eliminados com maior rapidez (Hrubant e Rhodes, 1989).

A comparação entre as curvas de sobrevivência de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo com as curvas de crescimento de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B podem ser vistas na figura 5.26. Assim como ocorreu com os coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positivo deixou de ser isolado após o 15º dia de maturação.

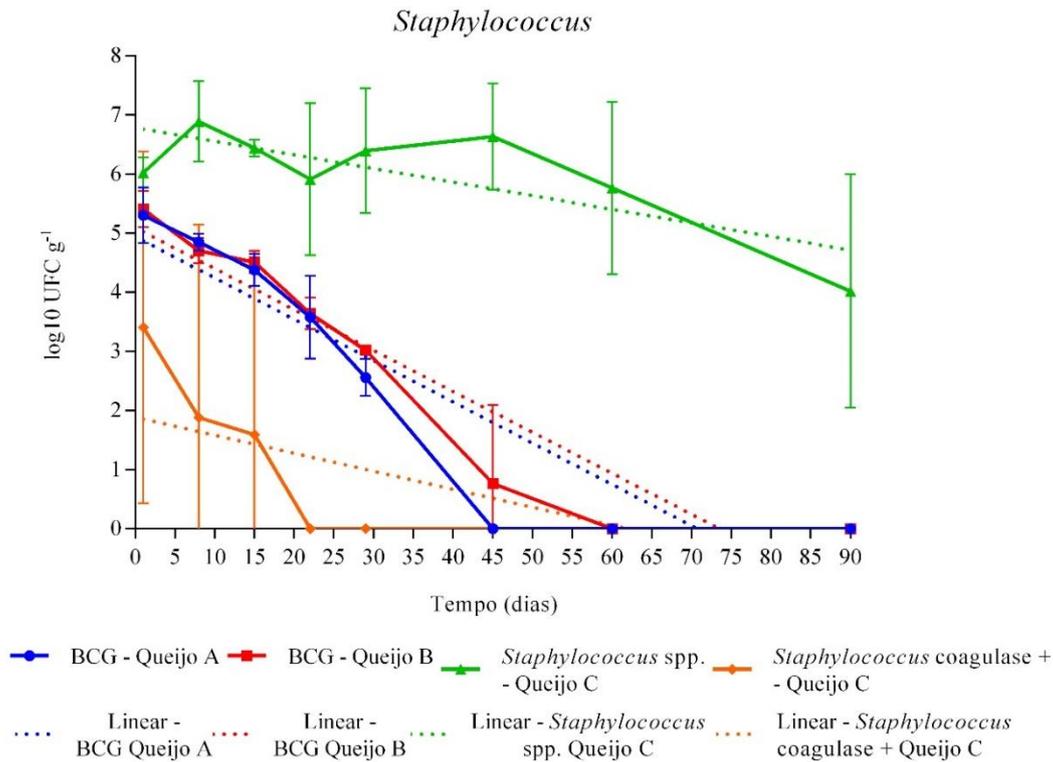


Figura 5.26. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,59$, ◆ $R^2 = 0,52$. Barras de erro indicam desvio padrão.

Apenas a curva de contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo apresentou correlação positiva e significativa ($P < 0,05$) com as curvas de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B. A correlação entre *M. bovis* BCG e *Staphylococcus* coagulase positivo pode ter ocorrido de forma indireta, assim como na relação entre a micobactéria e os coliformes. Isso porque *Staphylococcus* coagulase positivo também não foi resistente às condições ambientais dos queijos tipo Minas artesanal.

A correlação entre as curvas de sobrevivência de *M. bovis* BCG de ambos os tratamentos e *Staphylococcus* spp. não apresentou correlação significativa ($P > 0,05$). É provável que isso tenha ocorrido, uma vez que *Staphylococcus* spp. manteve-se viável por todo o período analisado sempre em concentrações acima de 10^4 UFC/g.

Alguns autores já relataram a produção de proteínas por *Staphylococcus* com ação contra micobactérias. Stazima, uma partícula proteica produzida por uma amostra de *Staphylococcus* coagulase negativo, foi capaz de apresentar ação antagonista contra *M. avium* ao lisar sua parede celular (Rastogi *et al.*, 1998). Proteínas isoladas de *Staphylococcus haemolyticus*, também caracterizado como *Staphylococcus* coagulase negativo, foram capazes de lisar a parede celular de *M. smegmatis*, além de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG, *M. vaccae* e *M. kansasii* (Hassi *et al.*, 2007). Assim, ainda que não tenha havido uma correlação significativa entre *M. bovis* BCG e *Staphylococcus* spp, a presença desse micro-organismo, que se manteve viável ao longo de toda a maturação, pode ter auxiliado na eliminação da micobactéria.

A curva da viabilidade de fungos quando comparadas às curvas de viabilidade de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B encontra-se na figura 5.27.

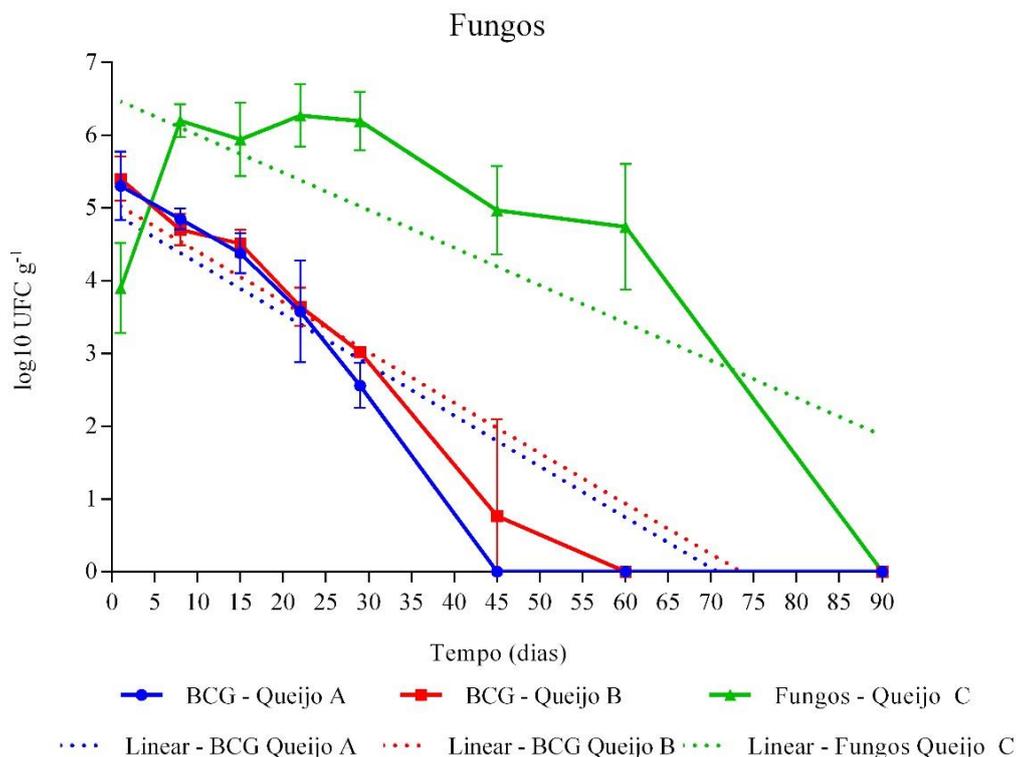


Figura 5.27. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e fungos em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias; . ● R² = 0,82, ■ R² = 0,88, ▲ R² = 0,51. Barras de erro indicam desvio padrão.

Para ambos os tratamentos, a presença de fungos não influenciou a contagem de *M. bovis* BCG ($P > 0,05$). O crescimento acelerado no início da maturação seguido por uma estabilidade na contagem de bolores e leveduras é um padrão descrito na literatura (Fox *et al.*, 2000).

Pode-se argumentar que o desenvolvimento de bolores e leveduras ocorre principalmente na parte externa do queijo (Fox *et al.*, 2000). Isso porque a baixa umidade da casca e alta concentração de cloretos permitem o desenvolvimento livre desses organismos, enquanto que o interior de uma peça de queijo ainda oferece competição exacerbada pelos nutrientes. Como *M. bovis* BCG é microaerófilo (Rowe e Donaghy, 2008), sua localização na parte mais interna do queijo pode ter diminuído o contato entre esses organismos nas peças, sem que houvesse uma interação real entre eles.

Ainda que não tenha havido relação direta nos queijos tipo Minas artesanal, a literatura consultada indica que a correlação entre fungos e micobactérias ambientais pode ser benéfica (Torvinen *et al.*, 2006), com relatos de simbiose entre os organismos até na degradação de combustíveis fósseis (Li *et al.*, 2008). Entretanto, metabólitos de fungos já foram identificados como micotóxicos em ensaios *in vitro* (Höller *et al.*, 2000). De qualquer maneira, as espécies de fungos muito provavelmente foram diferentes das do presente estudo, visto que foram isoladas de alvenaria úmida, diesel e esponjas marinhas, matrizes bastante distintas de queijo.

É interessante relatar que a presença de fungos nas amostras prejudicou em algumas situações o isolamento de *M. bovis* BCG no ágar 7H11 (figura 5.28). O mesmo problema foi encontrado por outros pesquisadores (Forgrave *et al.*, 2014; Forgrave *et al.*, 2016, Starikoff *et al.*, 2016). Uma forma de minimizar a contaminação nos meios de cultura é a utilização de verde malaquita. Como esse composto orgânico pode afetar o crescimento de micobactérias, preferiu-se não o utilizar no ágar 7H11, como sugerem Forgrave e colaboradores (2014). Pela imagem, entretanto, é possível perceber que a presença de fungos não inibiu o crescimento de *M. bovis* BCG e o material pode ser utilizado para contagem da micobactéria.

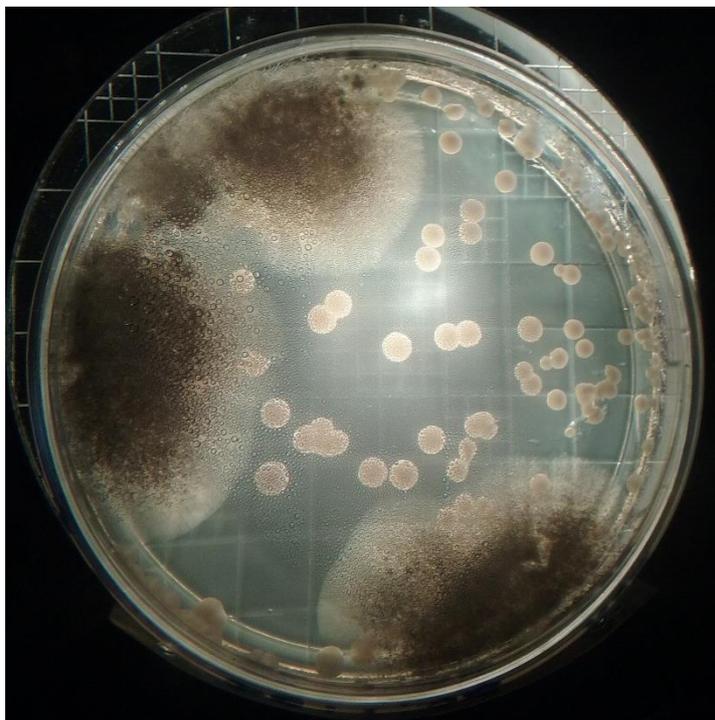


Figura 5.28. Contaminação de placas de ágar 7H11 por fungos

5.3.10. Correlação entre parâmetros físico-químicos e contagem de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B ao longo da maturação queijo tipo Minas artesanal

Os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos dos queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação podem ser vistos nas tabelas 5.11 e 5.12. Percebe-se, pelos dados apresentados, um aumento considerável no extrato seco total (EST) e que, na segunda semana de maturação, os queijos já se adequavam ao padrão de umidade imposto pela legislação estadual, de 45,9% (Minas Gerais, 2002). Acompanharam o aumento do valor de EST as porcentagens de gordura e proteína, visto que esses parâmetros estão correlacionados à secagem dos queijos durante a maturação. Portanto, à medida que a água se evaporava dos queijos tipo Minas artesanal, todos esses constituintes aumentavam sua participação na massa dos produtos.

Tabela 5.11. Resultados médios de análises físico-químicas, seus coeficientes de variação (%) e seus intervalos de confiança de amostras de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

	Acidez			pH			Umidade			EST		
	%	CV	IC % (95%)	%	CV	IC (95%)	%	CV	IC % (95%)	%	CV	IC % (95%)
1	0,27	45%	0,17 – 0,36	5,21	4,1%	5,04 – 5,38	54,38	3,2%	53 – 55	45,61	3,8%	44 – 46
8	0,44	19%	0,37 – 0,5	4,91	1,3%	4,86 – 4,96	29,63	5,1%	28 – 30	70,36	2,1%	69 – 71
15	0,44	13%	0,4 – 0,49	4,75	4,5%	4,58 – 4,91	21,98	4,8%	20 – 23	78,01	1,3%	76 – 79
22	0,50	42%	0,33 – 0,66	4,84	1,2%	4,79 – 4,88	20,56	2,7%	20 – 20	79,43	0,7%	79 – 79
29	0,44	18%	0,37 – 0,51	4,78	1,9%	4,7 – 4,86	17,89	10,2%	16 – 19	82,10	2,2%	80 – 83
45	0,46	8%	0,43 – 0,49	4,73	1,8%	4,66 – 4,8	15,32	3,6%	14 – 15	84,67	0,6%	84 – 85
60	0,43	30%	0,26 – 0,52	4,78	1,1%	4,73 – 4,84	14,08	5%	13 – 14	85,91	0,8%	85 – 86
90	0,42	17%	0,34 – 0,49	4,67	2,7%	4,53 – 4,8	12,81	4,5%	12 - 13	87,18	0,6%	86 – 87

Tabela 5.12. Resultados médios de análises físico-químicas, seus coeficientes de variação (%) e seus intervalos de confiança de amostras de queijos tipo Minas artesanal ao longo da maturação a 22°C por 90 dias

	ESD			Gordura			Proteína			Cloreto de sódio		
	%	CV	IC % (95%)	%	CV	IC % (95%)	%	CV	IC % (95%)	%	CV	IC % (95%)
1	18,19	9,9%	16 – 19	27,4	8,6%	25 – 29	16,62	3,5%	16 – 17	1,1	11,1%	1 – 1,19
8	29,05	11,7%	26 – 31	41,3	7,6%	38 – 43	24,99	7%	23 – 26	1,7	14,6%	1,51 – 1,89
15	37,07	4,9%	36 – 41	40,9	8,2%	38 – 43	27,28	8,6%	25 – 29	2,05	11,5%	1,75 – 2,34
22	36,55	12,1%	32 – 40	42,8	9,6%	39 – 46	27,96	8,5%	26 – 29	1,92	14,1%	1,71 – 2,13
29	38,10	25,1%	28 – 44	44	20,4%	37 – 50	29,21	4%	28 – 30	2,01	13,6%	1,78 – 2,24
45	37,42	21,9%	29 – 45	47,2	15,1%	41 – 53	29,47	6,3%	28 – 30	2,11	14,2%	1,83 – 2,38
60	34,54	38%	19 – 46	51,3	20,6%	44 – 61	31,13	5,9%	29 – 32	2,15	15,4%	1,81 – 2,5
90	34,78	18%	27 - 39	52,4	11,6%	47 - 60	33,41	2,9%	32 – 34	2,19	15,5%	1,83 – 2,54

Os resultados das tabelas 5.11 e 5.12 indicam que a diminuição de umidade foi mais rápida que a redução deste parâmetro normalmente observada em queijos Minas artesanais maturados nas queijarias de origem (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016) e o produto final atingiu concentrações de umidade menores que as do produto original ao longo de toda a maturação. Essa redução rápida pode ser atribuída à umidade da câmara BOD onde os queijos se encontravam e que, por muitas vezes, esteve entre 60% e 65%, abaixo daquela definida para a região da Serra da Canastra (Instituto Nacional..., 2016). Como consequência, os outros parâmetros físico-químicos também apresentaram alteração acelerada, porque suas concentrações são um valor relativo e dependem da porcentagem de água do produto.

A evaporação de água nos queijos, provocada pela temperatura de maturação e pela baixa umidade do ar, pode ter tido também uma relação com a eliminação de *M. bovis* BCG tanto pela aceleração do ressecamento quanto por permitir um crescimento mais rápido da microbiota competidora, principalmente BAL. É sabido que temperaturas mais baixas de maturação beneficiam a sobrevivência de micobactérias em queijos durante a maturação ou estocagem (Michel *et al.*, 2015).

O coeficiente de variação dos parâmetros físico-químicos, ao contrário daqueles microbiológicos, manteve-se estável, como descrito anteriormente na literatura (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016). Isso ocorre porque esses parâmetros não variam tanto entre as repetições (Sampaio, 2010).

A correlação entre as contagens de *M. bovis* BCG e os parâmetros físico-químicos dos queijos tipo Minas artesanais ao longo da maturação podem ser vistos na tabela 5.13.

Tabela 5.13. Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros físico-químicos de amostras de queijo Minas artesanal durante 90 dias de maturação a 22°C e as contagens de *M. bovis* BCG dos tratamentos A e B

		Tratamento A	Tratamento B
Acidez	Coeficiente	-0,1464	-0,03593
	P	0,6587	0,9159
pH	Coeficiente	0,7563	0,5749
	P	0,0923	0,1427
Umidade	Coeficiente	0,9759*	0,9940*
	P	0,0003	< 0,0001
EST	Coeficiente	-0,9759*	-0,9940*
	P	<0,0001	< 0,0001
ESD	Coeficiente	-0,4636	-0,3713
	P	0,2271	0,3448
Gordura	Coeficiente	-0,9515*	-0,9701*
	P	0,0003	< 0,0001
Proteína	Coeficiente	-0,9759*	-0,9940*
	P	< 0,0001	< 0,0001
Cloretos	Coeficiente	-0,9027*	-0,9222*
	P	0,0027	0,0017

* Correlação significativa (P < 0,05)

As correlações individuais entre parâmetros físico-químicos e a viabilidade de *M. bovis* BCG encontram-se nas figuras 5.29 a 5.35.

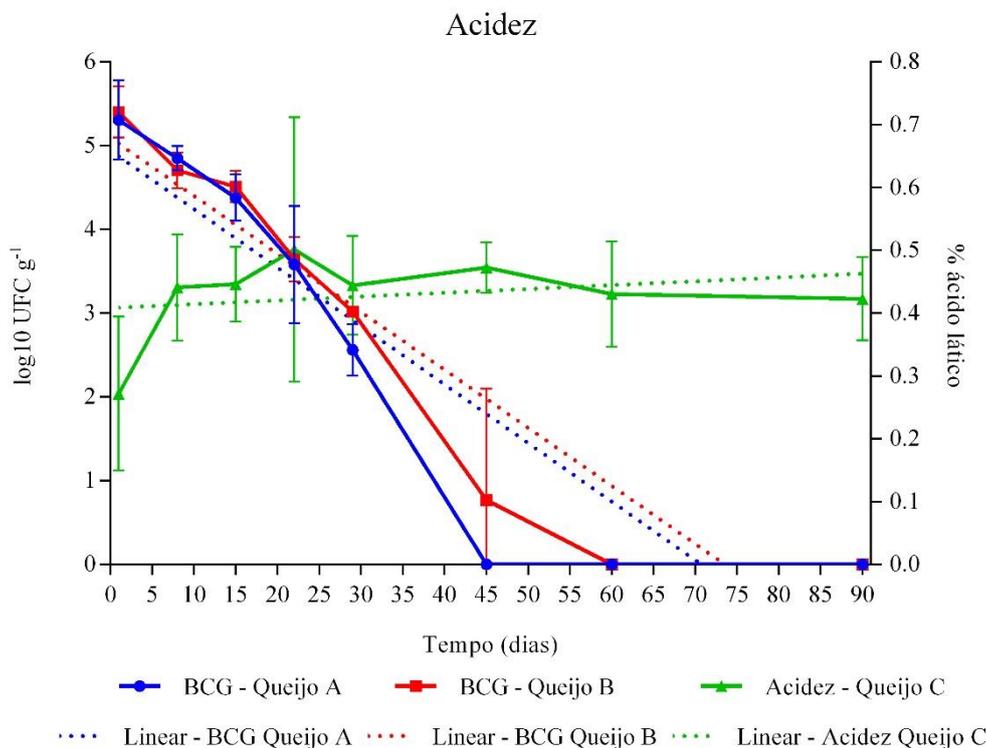


Figura 5.29. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na concentração de ácido láctico amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,06$. Barras de erro indicam desvio padrão.

Para ambos os parâmetros, acidez titulável e pH, não houve correlação ($P > 0,05$) entre as curvas de pH ou de concentração de ácido láctico e a sobrevivência de *M. bovis* BCG nos tratamentos A e B. Ambos os parâmetros apresentaram uma alteração rápida no início da maturação, o pH caindo e a acidez aumentando. Após esse período, os níveis se normalizam, visto que a proteólise do queijo libera nitrogênio e impede uma redução do pH, e alguns micro-organismos como as BAL passam a utilizar o ácido láctico como fonte de carboidrato, o consumindo (Spahr e Schafroth, 2001).

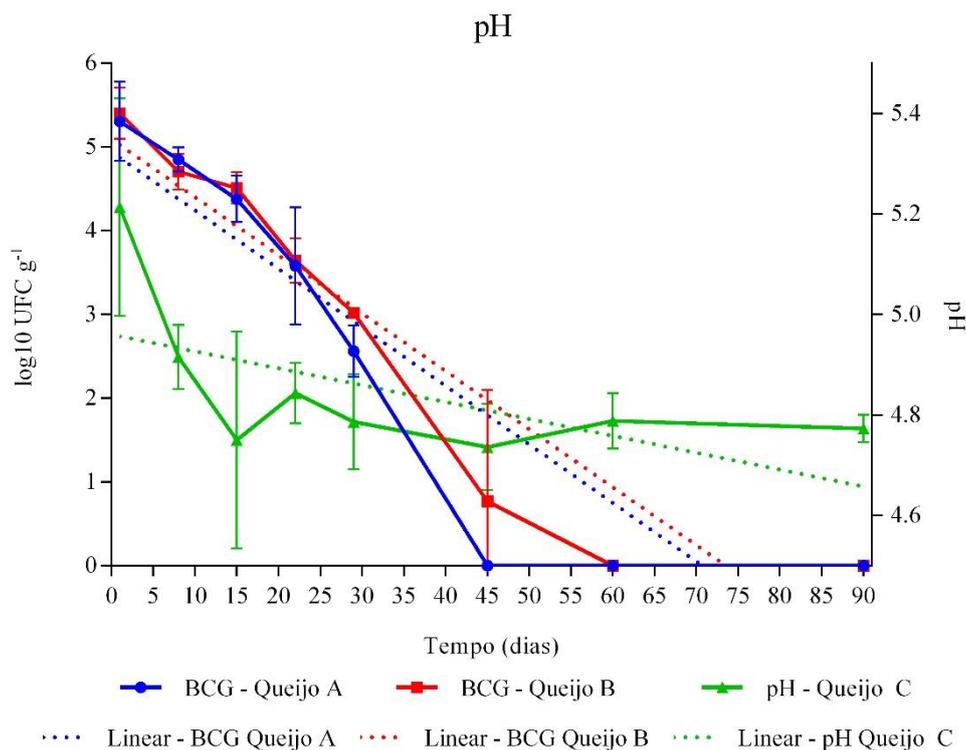


Figura 5.30. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e em pH amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● R² = 0,82, ■ R² = 0,88, ▲ R² = 0,48. Barras de erro indicam desvio padrão.

Micobactérias são reconhecidas como bacilo ácido resistentes e tal qualidade é relacionada à sua virulência e sua manutenção em fagócitos no hospedeiro durante a infecção. Duas características principais estão ligadas à sobrevivência desses micro-organismos em ambientes ácidos: uma espessa camada lipídica da parede celular, que age como uma barreira primária contra ácidos, e uma bomba de prótons, capaz de manter homeostase intracelular (Rao *et al.*, 2001; Rua-Domenech, 2006; Vandal *et al.*, 2009). É possível que esses fatores foram responsáveis pelo resultado do presente trabalho. Assim, em queijos tipo Minas artesanal, a concentração de ácidos e pH não afetou a sobrevivência de *M. bovis* BCG. Pode-se argumentar que o valor mínimo de pH, 4,67, não foi suficientemente baixo para alterar a homeostasia interna da célula.

A literatura consultada apresentou diversos trabalhos que descreveram a viabilidade de *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* e MAP em produtos lácteos com baixo pH e alta acidez. Muitos confirmaram os resultados vistos em queijos tipo Minas artesanal, enquanto outros indicaram que ambientes ácidos aumentaram a mortalidade desses micro-organismos.

Para que *M. bovis* BCG mantenha-se viável, foi definido que seu pH interno deve permanecer acima de 6. Ainda que 4,67 seja um valor inferior a 6, bombas de prótons localizadas na membrana plasmática conseguem regular o pH interno da micobactéria para que esse esteja em um intervalo de pH de 6,5 a 7, considerado ideal (Rao *et al.*, 2001). Essa homeostasia é necessária em uma situação de infecção, *in vivo*, quando o micro-organismo contamina um animal e precisa sobreviver à acidez de macrófagos (Jordao *et al.*, 2008). Entretanto, o mesmo valor de pH 4,67, encontrado no queijo tipo Minas artesanal, pode barrar a multiplicação de *M. bovis* BCG.

Acredita-se que o micro-organismo, nessa situação, passa a direcionar seu gasto energético para manter estável seu pH interno (Rao *et al.*, 2001).

O ambiente de queijos, ainda que ácido, parece exercer uma certa proteção sobre a viabilidade de micobactérias. Isso porque há uma grande concentração de gordura e proteína que, emulsificadas com o restante da umidade, protegem até certo grau a membrana plasmática das micobactérias da acidez do ambiente (Van Brandt *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2015). Todos os trabalhos consultados determinaram que o pH e a acidez titulável de diversos queijos não estavam correlacionados à mortalidade de *M. bovis* e MAP ao longo da maturação (Spahr e Schafroth, 2001; Donaghy *et al.*, 2004; Ikonomopoulos *et al.*, 2005; Cironi *et al.*, 2006; Hanifian, 2014a; Forgrave *et al.*, 2016).

Entretanto, os trabalhos conduzidos em leites fermentados, incluindo iogurtes e kefir, demonstraram que a acidez estava correlacionada à morte das micobactérias. Em estudo com leite fermentado, MAP foi inibido pela acidez do produto quando esse atingiu um pH abaixo de 3,9 (Klanicova *et al.*, 2012). Esse valor, porém, não é compatível com o pH de queijos e muito inferior aos vistos nos queijos tipo Minas artesanal. Em kefir, a viabilidade de *M. bovis* BCG também foi afetada pelo pH do produto. Nesse estudo, a micobactéria não resistiu a pH abaixo de 4 (Macuamule *et al.*, 2016). Pode-se argumentar que o pH de leites fermentados esteve sempre abaixo daqueles medidos em queijos e, assim, conseguiu afetar a homeostasia intracelular das micobactérias estudadas.

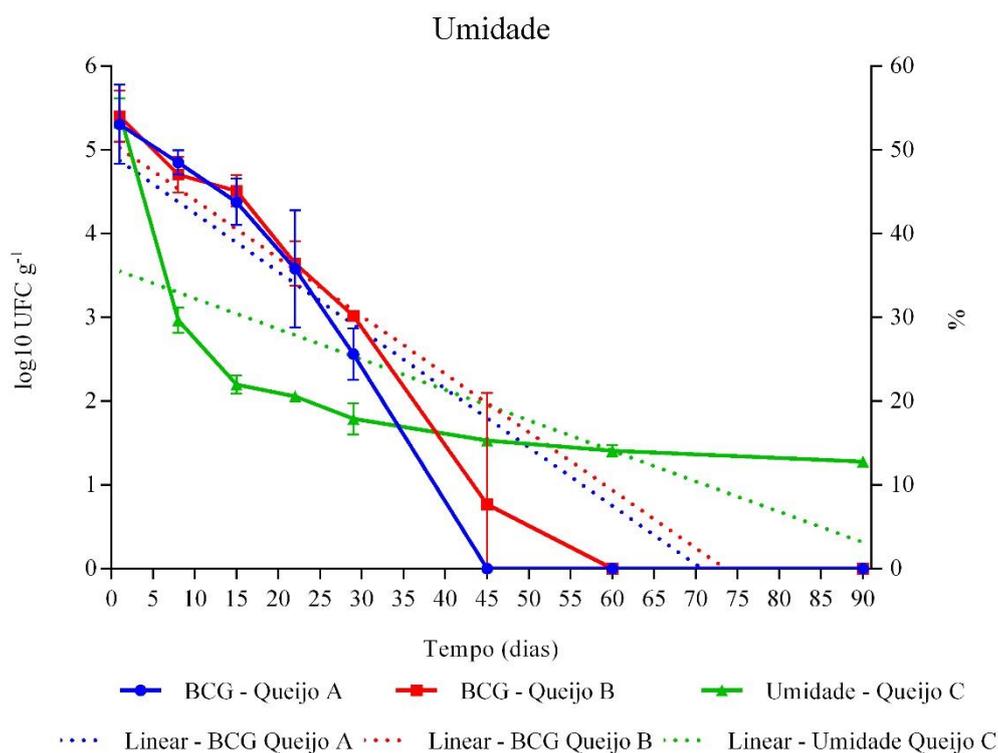


Figura 5.31. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de umidade de amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,50$. Barras de erro indicam desvio padrão.

Por fim, ainda que não tenha sido medido, os queijos do tratamento A poderiam ter apresentado pH menor e acidez titulável maior que descritos ao longo da maturação. Isso porque havia uma concentração maior de BAL que, nessas condições, acidificariam ainda mais o queijo. A medição

de pH e acidez titulável não foram realizadas para o tratamento A para que não houvesse o manuseio de *M. bovis* BCG fora da capela de fluxo laminar vertical.

Os resultados de teores de umidade de extrato seco total (EST) e a correlação entre a viabilidade de *M. bovis* BCG encontram-se nas figuras 5.31 e 5.32. Ambos os parâmetros apresentaram correlação significativa ($P < 0,05$) com a curva de sobrevivência da micobactéria, sendo a correlação com a umidade positiva e a com EST, negativa. Esses dois parâmetros encontram-se intimamente relacionados, pois ambos dependem da quantidade de água disponível no produto (Brasil, 2006).

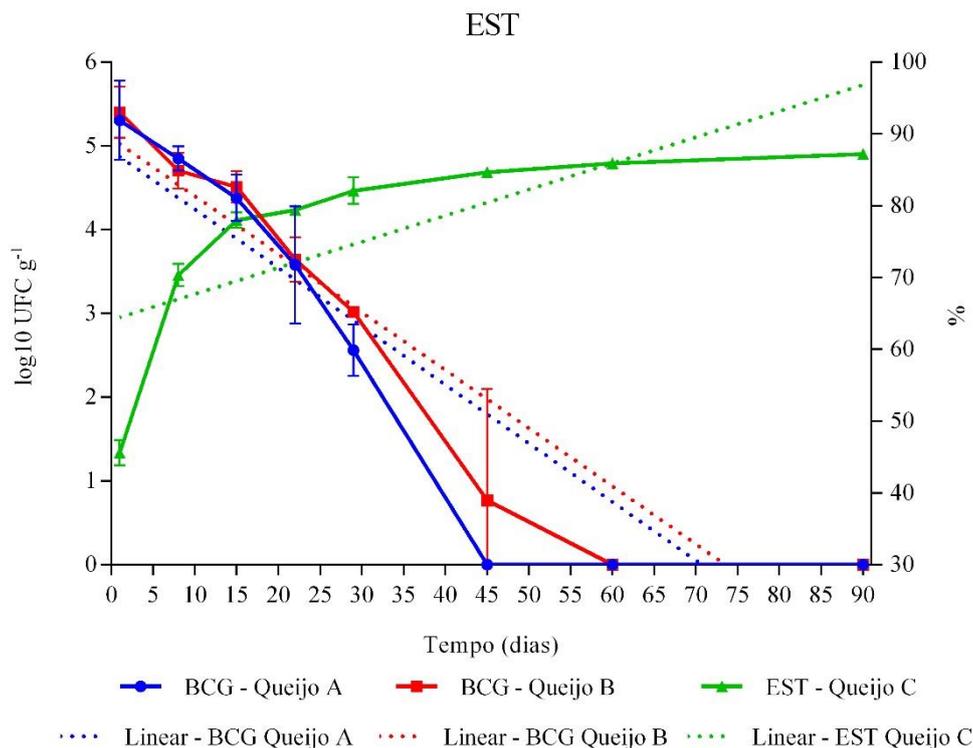


Figura 5.32. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de extrato seco total de amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,50$. Barras de erro indicam desvio padrão.

A viabilidade de *M. bovis* depende da umidade presente no ambiente onde se encontra. Isso porque a água serve como base para todas as atividades metabólicas de micro-organismos (Jay *et al.*, 2005). Assim, concentrações baixas de água, como aquelas registradas no queijo tipo Minas artesanal, determinaram de forma negativa a sobrevivência de *M. bovis* BCG ao longo da maturação. Resultado semelhante foi visto em estudo em que MAP apresentou tempo maior de sobrevivência em queijos Tisliter, de média umidade (40%) quando comparados com queijos Emmentaler, de baixa umidade (37-38%). Os autores argumentaram que as condições da matriz do Tisliter favoreceram a viabilidade do micro-organismo quando comparada com a do Emmentaler (Spahr e Schafroth, 2001). Nesse trabalho, portanto, a umidade também foi correlacionada com a sobrevivência de MAP.

Entretanto, *M. bovis* se manteve viável em queijos Cheddar com umidade mínima de 32,13%, similar àquela encontrada em queijo tipo Minas artesanal. Nesse experimento, o micro-organismo

sobreviveu por até 393 dias, mesmo em condições extremas. Os autores, todavia, não justificaram essa resposta do patógeno (Forgrave *et al.*, 2016). Em queijo tipo parmesão, *M. bovis* sobreviveu por pelo menos 60 dias em atividade de água mínima de 0,976 e porcentagem de umidade de 38,4% (Starikoff *et al.*, 2016). Ainda que os parâmetros A_w e umidade não sejam imediatamente comparáveis, percebe-se que nos queijos tipo parmesão, as condições de água disponível estavam bastante favoráveis para o micro-organismo, que refletiram no longo tempo em que o patógeno permaneceu viável (Merwe e Michel, 2010). A mesma resposta foi vista na sobrevivência de MAP em queijo branco ultra-filtrado, em que a umidade do produto se manteve entre 64 e 65%. Como manteve-se alta, ela não foi correlacionada de forma significativa com a diminuição da contagem da micobactéria (Hanifian, 2014a).

É importante fazer um contraponto com os resultados desses últimos trabalhos (Hanifian, 2014a; Forgrave *et al.*, 2016; Starikoff *et al.*, 2016) e a produção de queijo Minas artesanal. A maturação ou estocagem dos queijos desses experimentos foi feita de forma a não permitir a perda de água, tanto pelo controle do ambiente quanto pela embalagem. Assim, a umidade desses produtos permaneceu estável ao longo da maturação. O queijo Minas artesanal, em sua origem, não apresenta um ambiente totalmente controlado, e a cura é feita em queijaria telada, mas sujeita às condições climáticas locais. A comparação, portanto, deve levar em conta essas condições e, assim, sugerir que a sobrevivência do patógeno pode ser dificultada no queijo Minas artesanal.

Dentre os padrões físico-químicos relacionados à composição do de queijo Minas artesanal, apenas extrato seco desengordurado não esteve correlacionado de forma significativa ($P > 0,05$) à redução da viabilidade de *M. bovis* BCG ao longo da maturação (figura 5.33). Isso porque ele dependia do valor da umidade, que caiu consideravelmente, e da gordura, que aumentou ao longo do período. Assim, sua estabilidade não apresentou correlação significativa com a eliminação da micobactéria.

A correlação negativa e significativa ($P < 0,05$) entre teor de gordura e contagem de *M. bovis* BCG (figura 5.34) nos queijos foi resultado da rápida diminuição de umidade. Na literatura consultada, a gordura é apresentada como um fator protetor de micobactérias tanto *in vitro* quanto *in situ* e *in vivo* (Van Brandt *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2015; Aguilar-Ayala *et al.*, 2017), além de agir como sequestradora de bacteriocinas, tornando-as indisponíveis para agirem contra o patógeno (Chin *et al.*, 2016). Entretanto, a alta concentração de gordura, acima de 40% ainda no início da maturação, não foi suficiente para conter a redução de *M. bovis* BCG em ambos os tratamentos estudados. A porcentagem de gordura presente nos queijos foi descrita apenas nos trabalhos de viabilidade de *M. bovis* em queijo Cheddar e Caerphilly (Forgrave *et al.*, 2014; Forgrave *et al.*, 2016). Ainda assim, sua presença não foi correlacionada com a sobrevivência do patógeno nesses produtos.

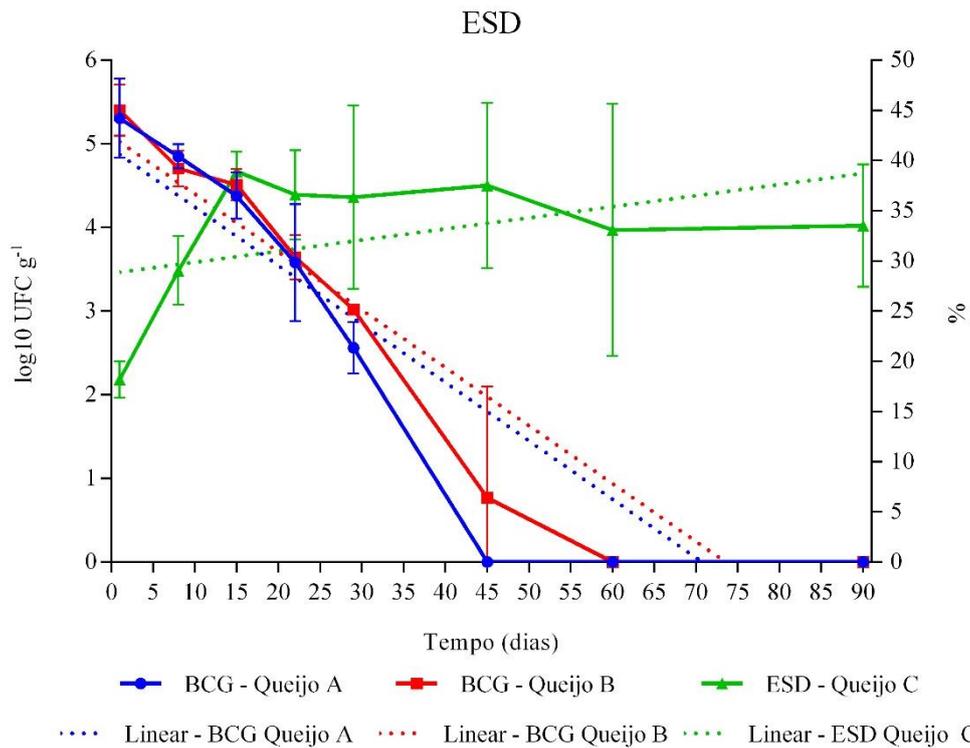


Figura 5.33. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de extrato seco desengordurado em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,20$. Barras de erro indicam desvio padrão.

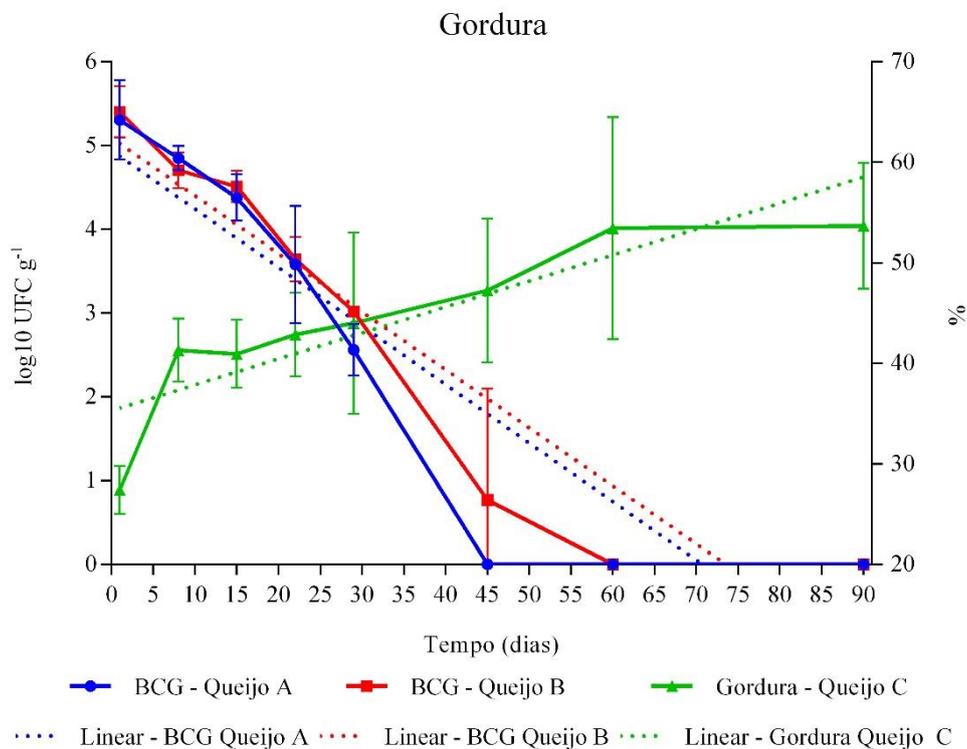


Figura 5.34. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de gordura em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,72$. Barras de erro indicam desvio padrão.

A relação negativa e significativa ($P < 0,05$) entre teor de proteína e cloreto de sódio e a curva de sobrevivência de *M. bovis* BCG nos queijos podem ser vistas nas figuras 5.35 e 5.36.

Em relação às proteínas, a correlação significativa se deve exclusivamente à perda de umidade do produto (figura 5.35). Embora a caseína pode, em conjunto com a gordura, proteger a micobactéria de efeitos deletérios (Van Brandt *et al.*, 2011), no caso do queijo tipo Minas artesanal, isso não foi suficiente para manter o micro-organismo vivo.

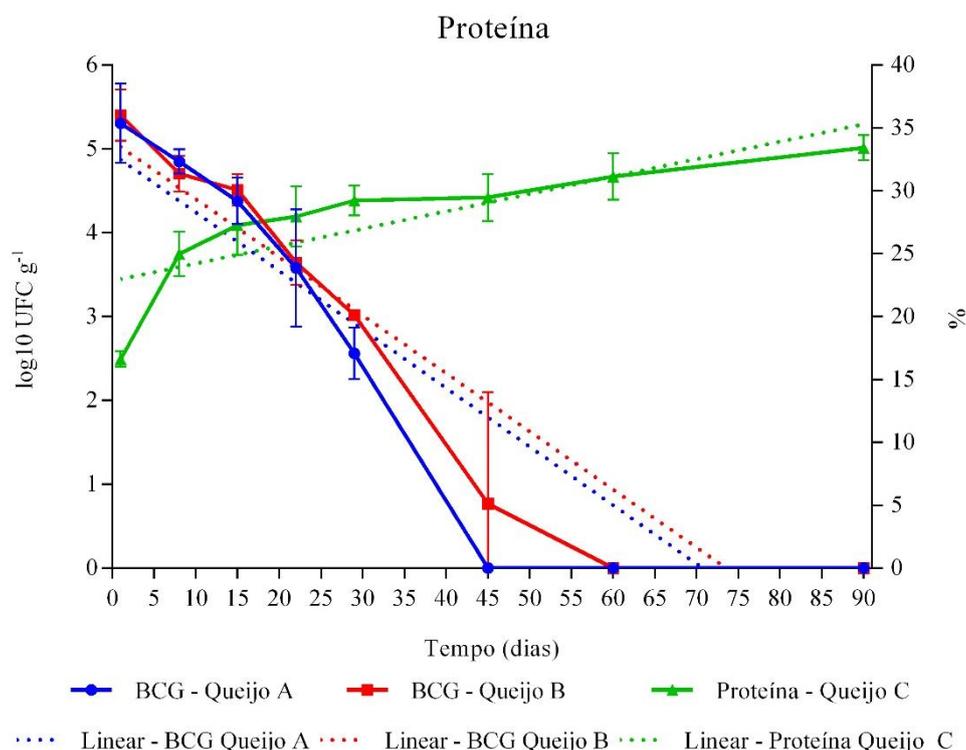


Figura 5.35. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de proteína em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,66$. Barras de erro indicam desvio padrão.

Também houve uma correlação significativa e negativa entre a contagem de *M. bovis* BCG e a concentração de cloreto de sódio. É sabido que a presença de sal em produtos lácteos diminui a viabilidade de diversos patógenos, visto que diminui a disponibilidade de água para a sobrevivência desses micro-organismos (Jay *et al.*, 2005). Ainda assim, diversos trabalhos com bactérias do gênero *Mycobacterium* relataram que, ainda que a concentração de cloreto de sódio aumente durante a maturação, essa situação parece não afetar a sobrevivência de micobactérias (Sung e Collins, 2000; Spahr e Schafroth, 2001; Donaghy *et al.*, 2004; Forgrave *et al.*, 2016). Dessa forma, a correlação entre os dois parâmetros estudados no queijo tipo Minas artesanal pode ter sido independente.

Concentrações de 1,5% a 2% de sal, semelhantes às vistas em queijo tipo Minas artesanal, já foram descritas em queijo Emmentaler, Cheddar e Caerphilly inoculados experimentalmente com MAP e *M. bovis*. Ainda que cloreto de sódio tenha sido responsabilizado como deletério durante a produção do queijo, sua presença ao longo da maturação não foi correlacionada com a viabilidade do patógeno bovino (Spahr e Schafroth, 2001; Donaghy *et al.*, 2004; Forgrave *et al.*,

2016). Concentrações ainda superiores de sal, entre 3 e 4%, também não foram relacionadas à inativação de MAP em queijos brancos ultrafiltrados (Hanifian, 2014).

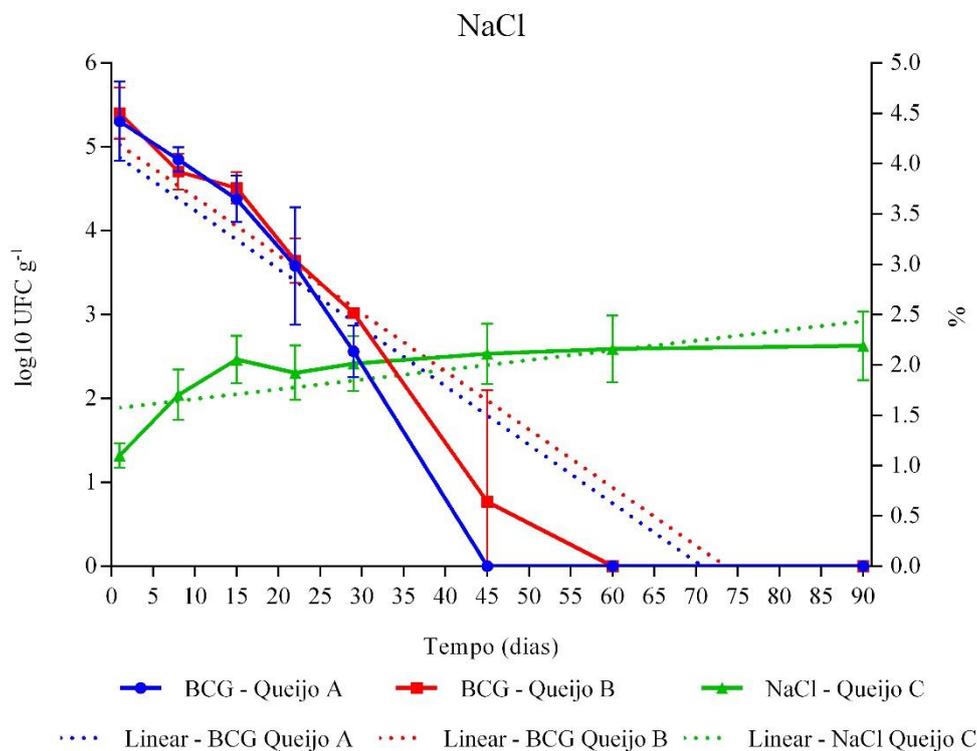


Figura 5.36. Variação na contagem média de *M. bovis* BCG (tratamentos A e B) e na porcentagem de cloreto de sódio em amostras de queijo tipo Minas artesanal durante a maturação a 22°C por 90 dias. ● $R^2 = 0,82$, ■ $R^2 = 0,88$, ▲ $R^2 = 0,35$. Barras de erro indicam desvio padrão.

5.4. Conclusões

O presente trabalho determinou que *Mycobacterium bovis* BCG inoculado durante a elaboração de queijo tipo Minas artesanal não sobrevive além de 60 dias de maturação a 22°C. A inoculação adicional de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal acelerou a capacidade em antagonizar *Mycobacterium bovis* BCG *in situ*, permitindo a ausência da micobactéria após 45 dias de produção. Também foi demonstrado que a inativação de *M. bovis* BCG em queijo tipo Minas artesanal ocorre por uma junção de fatores, principalmente presença em alta concentração de bactérias ácido-láticas e baixa porcentagem de umidade.

6. Considerações finais

Ao transferir o resultado do presente trabalho para a realidade das propriedades elaboradoras de queijos Minas artesanais, deve-se considerar principalmente que, ainda que seu rebanho não se encontre dentre os fatores de risco identificados para tuberculose bovina, o queijo Minas artesanal está sendo comercializado após a maturação por um período menor que o determinado pelo estudo. Também não há controle sanitário adequado do produto final, pois a legislação não contempla a pesquisa de *Mycobacterium bovis* em queijos artesanais.

Assim, atitudes devem ser tomadas para que se exclua o risco da transmissão de tuberculose por *M. bovis* para os consumidores de queijo Minas artesanal. A pasteurização do leite e a maturação superior a 60 dias não são adequadas para a situação, visto que ambas descaracterizam o produto. Como as BAL isoladas de queijos Minas artesanal demonstraram capacidade em antagonizar *M. bovis* BCG tanto *in vitro* quanto *in situ*, pode-se considerar a aplicação delas como adjuvantes no controle de *M. bovis* em leite. Seria interessante a formação de bancos de BAL de cada região produtora com micro-organismos identificados e comprovados para o antagonismo dessa micobactéria. Essas BAL seriam então utilizadas como cultura auxiliadora na produção do queijo Minas artesanal.

A maturação, ainda que importante para eliminar micro-organismos indesejáveis e permitir a identidade de queijo Minas artesanal, não deve ser utilizada para assegurar a inativação de *M. bovis*. Para a eliminação do micro-organismo em queijo, deve-se garantir a origem do leite, que deve vir de rebanho negativo para a tuberculose bovina, e também as boas práticas de produção.

Entretanto, nenhum passo é mais importante e garante um melhor resultado que a eliminação completa da tuberculose bovina em rebanhos que forneçam leite para a produção de queijo Minas artesanal. Deve haver um esforço conjunto dos setores de assistência técnica, sanidade animal e inspeção sanitária e, principalmente, aporte maciço de recurso por parte do Estado tanto para diagnosticar a doença em animais quanto para eliminar e substituir os animais infectados. A inspeção dos queijos Minas artesanal também são um ponto imprescindível no controle da tuberculose zoonótica, principalmente se vier acompanhada da extensão rural, com educação sanitária aos produtores e, por fim, da conscientização de consumidores do queijo Minas artesanal.

Por fim, o presente estudo, ainda que tenha elucidado algumas questões em relação à presença e viabilidade de *M. bovis* BCG em queijo Minas artesanal, abriu maiores questionamentos quanto ao tema. Entre eles encontram-se qual a realidade da presença de *M. bovis* em queijos Minas artesanal sendo vendidos no país e qual a real importância da tuberculose zoonótica no Brasil, principalmente daquela causada pelo consumo de queijos artesanais.

7. Referências bibliográficas

- ABRAHÃO, R.; NOGUEIRA, P.; MALUCELLI, M. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v. 10, n. 2, 2005.
- ACURCIO, L. B.; BASTOS, R. W.; SANDES, S. H. D. C. *et al.* Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. *Journal of Functional Foods*, v. 33, n. Supplement C, p. 436-445, 2017a.
- ACURCIO, L.; SANDES, S.; BASTOS, R. *et al.* Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. *Beneficial Microbes*, v. 8, n. 4, p. 579-588, 2017b.
- ADESOKAN, H.; JENKINS, A.; VAN SOOLINGEN, D. *et al.* *Mycobacterium bovis* infection in livestock workers in Ibadan, Nigeria: evidence of occupational exposure. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 16, n. 10, p. 1388-1392, 2012.
- ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD. *Mycobacterium bovis – Risk assessment related to exposure via meat and meat products*. 2017. Disponível em: <https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/acm_1261_m_bovis.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- AGUILAR-AYALA, D. A.; PALOMINO, J. C.; VANDAMME, P. *et al.* “Genetic regulation of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich environment”. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 55, n. Supplement C, p. 392-402, 2017.
- ALBUQUERQUE, L. C. (Ed.). *Queijos no Brasil*. Juiz de Fora: EPAMIG, 1986. 162 p.
- ALLEN, B. W. Mycobacteria: general culture methodology and safety considerations. *Mycobacteria Protocols*, p. 15-30, 1998.
- ALMEIDA, E. F. L. Aspectos sociais da produção de leite no Brasil. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JÚNIOR, E. V. (Ed.). *Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia de leite no Brasil*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 533 p.
- AMANFU, W. The situation of *tuberculosis* and *tuberculosis* control in animals of economic interest. *Tuberculosis*, v. 86, n. 3, p. 330-335, 2006.
- AMARANTE, J. O. A. *Queijos do Brasil e do Mundo: Para Iniciantes e Apreciadores*. São Paulo: Mescla, 2015. 344 p.
- AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D. D.; RODRIGUEZ, C. A. R. *et al.* Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008.
- AMENI, G.; TADESSE, K.; HAILU, E. *et al.* Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between farmers and cattle in central Ethiopia. *PloS One*, v. 8, n. 10, p. e76891, 2013.
- ANDRADE, C.; SOUZA, M.; PENNA, C. *et al.* *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1592-1600, 2014.

- ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. (2001). *Salmonella*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K.; ASSOCIATION, A. P. H. (Ed). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 2001.
- APONTE, M.; FUSCO, V.; ANDOLFI, R. *ET AL*. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *International Dairy Journal*, v. 18, n. 4, p. 403-413, 2008.
- ARAÚJO, R. A. B. M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá*. 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.
- ARFI, K.; LECLERQ-PERLAT, M. N.; BAUCHER, A. *et al*. Contribution of several cheese-ripening microbial associations to aroma compound production. *Le Lait*, v. 84, n. 5., p. 435-447, 2004.
- AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed). *Lactic Acid Bacteria*. Nova York : Marcel Dekker, 2004. 628 p.
- BAKER, M.; LOPEZ, L.; CANNON, M. *et al*. Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. *Epidemiology & Infection*, v. 134, n. 5, p. 1068-1073, 2006.
- BARBIERI, J. D. M.; OLIVEIRA, L. F. D.; DORNELES, E. M. S. *et al*. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. *Semina-Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3531-3548, 2016.
- BARBOSA, W. A. *A decadência das minas e a fuga da mineração*. Belo Horizonte: Imprensa da UFMG, 1971. 264 p.
- BELCHIOR, A. P. C.; LOPES, L. B.; GONÇALVES, V. S. P. *et al*. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 48, n. 2, p. 373-378, 2016.
- BENTLEY INSTRUMENT INC. Bactocount 150 Operator's Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 2002. 49p.
- BENTLEY INSTRUMENT INC. SomaCount 300 Operator's Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 1997. 116p.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. *et al*. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BESSER, R. E.; PAKIZ, B.; SCHULTE, J. M. *et al*. Risk factors for positive Mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. *Pediatrics*, v. 108, n. 2, p. 305-310, 2001.
- BEZOS, J.; ALVAREZ, J.; ROMERO, B. *et al*. Bovine tuberculosis: historical perspective. *Research in Veterinary Science*, v. 97, s. 3-4, 2014.

- BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F. *et al.* Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, v. 36, n. 3, p. 411-436, 2005.
- BLAND, C. S.; IRELAND, J. M.; LOZANO, E. *et al.* Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 10, p. 5719-5727, 2005.
- BÖHME, C.; MEYER-RATH, G.; MAGDORF, K. *et al.* Abdominelle tuberkulose im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, v. 155, n. 1, s. 1, p. 16-19, 2007.
- BOLAÑOS, C. A. D.; DE PAULA, C. L.; GUERRA, S. T. *et al.* Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, p. e40, 2017.
- BONSU, O.; LAING, E.; AKANMORI, B. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. *Acta Tropica*, v. 76, n. 1, p. 9-14, 2000.
- BOTSARIS, G.; SWIFT, B. M.; SLANA, I. *et al.* Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *International Journal of Food Microbiology*, v. 216, p. 91-94, 2016.
- BOUKARY, A.; THYS, E.; RIGOUTS, L. *et al.* Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 59, n. 6, p. 490-502, 2012.
- BOYLE, D. S.; MCNERNEY, R.; LOW, H. T. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. *PLOS one*, v. 9, n. 8, 2014.
- 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 11/03/1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 2 de 10/01/2001. 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. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 18/09/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília, 26 ago. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Cultura. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Decreto nº 3.551 de 04/08/2000. Registro número 4. Bem cultural: Modo artesanal de fazer Queijo de Minas, nas regiões do Serro e das serras da Canastra e do Salitre. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30 de 07/08/2013. Permite que os queijos feitos a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias. Brasília, 2013.

BRASIL. Decreto nº 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.

BROOKS-POLLOCK, E.; ROBERTS, G. O.; KEELING, M. J. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature*, v. 511, n. 7508, p. 228-231, 2014.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M. *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BRUMANO, E. C. C. *Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA na região do Serro-MG*. 2008. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

CACHAFEIRO-VILAR, A.; GARCÍA-PADILLA, C.; REYES, E. *et al.* Polyarticular arthritis secondary to *Mycobacterium bovis* infection: an unusual clinical presentation. *Joint Bone Spine*, v. 74, n. 1, p. 107-109, 2007.

CAMBIER, C.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, v. 159, n. 7, p. 1497-1509, 2014.

CARROLL, J.; DRAPER, L. A.; O'CONNOR, P. M. *et al.* Comparison of the activities of the lantibiotics nisin and lacticin 3147 against clinically significant mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36, n. 2, p. 132-136, 2010.

CARROLL, J.; O'MAHONY, J. Anti-mycobacterial peptides: made to order with delivery included. *Bioengineered Bugs*, v. 2, n. 5, p. 241-246, 2011.

CASSIDY, J. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2, p. 151-161, 2006.

CASTRO, R.; OLIVEIRA, L.; SANT'ANNA, F. *et al.* 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.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PROTECTION. *Human Tuberculosis Caused by Mycobacterium bovis: New York City, 2001–2004*. 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5424a4.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2015.

CHIN, Y.-Z.; VELU, S.; BAKAR, F. A. Characterization and the influence of milk solids-not-fat on the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S20 isolated from Chinese sauerkraut, a traditional fermented vegetable. *Annals of Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 673-684, 2016.

- CHUNG, H. J.; MONTVILLE, T.; CHIKINDAS, M. Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 31, n. 6, p. 416-420, 2000.
- CICERO, R.; OLIVERA, H.; HERNÁNDEZ-SOLIS, A. *et al.* Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and-negative Mexican patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 28, n. 5, p. 455-460, 2009.
- CIRONE, K. M.; MORSELLA, C. G.; COLOMBO, D. *et al.* Viability of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in elaborated goat and bovine milk cheese maturity. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, v. 40, n. 4, p. 507-513, 2006.
- CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G. *et al.* Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, v. 31, n. 1, p. 251-262, 2013.
- CLARK JR, D. L.; ANDERSON, J. L.; KOZICZKOWSKI, J. J. *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v. 20, n. 3, p. 197-202, 2006.
- CLEAVELAND, S.; SHAW, D. J.; MFINANGA, S. G. *et al.* *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis*, v. 87, n. 1, p. 30-43, 2007.
- COOK, A.; TUCHILI, L.; BUVE, A. *et al.* Human and bovine tuberculosis in the Monze District of Zambia—a cross-sectional study. *British Veterinary Journal*, v. 152, n. 1, p. 37-46, 1996.
- CÓRDOVA, E.; GONZALO, X.; BOSCHI, A. *et al.* Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology, microbiology and clinical presentation [Short communication]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 16, n. 3, p. 415-417, 2012.
- CORNER, L.; TRAJSTMAN, A.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 43, n. 4, p. 129-133, 1995.
- COSIVI, O.; GRANGE, J.; DABORN, C. *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 59, 1998.
- COSTA, H.; SOUZA, M.; ACÚRCIO, L. *et al.* Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.
- COTTER, T.; SHEEHAN, S.; CRYAN, B. *et al.* Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in humans in the south-west region of Ireland: is there a relationship with infection prevalence in cattle? *Tubercle and Lung Disease*, v. 77, n. 6, p. 545-548, 1996.
- COUSINS, D.; DAWSON, D. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970–1994. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 3, n. 8, p. 715-721, 1999.
- CUNHA, A. H. M. J. Queijo Minas artesanal. In: I SIMPÓSIO DE QUEIJOS ARTESANAIS DO BRASIL, I, 2011, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

- DALBY, A. *Cheese: a global history*. Londres: Reaktion Books, 2009. 154 p.
- DANKNER, W. M.; WAECKER, N. J.; ESSEY, M. A. *et al.* *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine*, v. 72, n. 1, p. 11-37, 1993.
- DANKNER, W. M.; DAVIS, C. E. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States–Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics*, v. 105, n. 6, p. e79-e79, 2000.
- DE KANTOR, I.; PAOLICCHI, F.; BERNARDELLI, A. *et al.* Bovine tuberculosis in Latin American countries. Current situation and recommendations. *Workshop sponsored by OIE, 3rd Latin American Congress on Zoonoses*. Buenos Aires, Argentina, 2008.
- DE KANTOR, I.; LOBUE, P.; THOEN, C. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean [Serialised article. *Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans*. Number 3 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 14, n. 11, p. 1369-1373, 2010.
- DIAS, J. C. *500 Anos de Leite no Brasil*. São Paulo: Calandra Editorial, 2006. 147 p.
- D-MAPS. 2017. Disponível em: < <http://www.d-maps.com> >. Acesso em 18/11/2017.
- DOLLAB, J. A. *Tuberculosis and the milk-supply*. *Public Health*, v. 13, p. 840-846, 1901.
- DONAGHY, J.; TOTTON, N.; ROWE, M. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, n. 4, p. 285-291, 2003.
- DONAGHY, J.; TOTTON, N.; ROWE, M. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 8, p. 4899-4905, 2004.
- DONAGHY, J. Lantibiotics as prospective antimycobacterial agents. *Bioengineered Bugs*, v. 1, n. 6, p. 437-439, 2010.
- DORAN, P.; CARSON, J.; COSTELLO, E. *et al.* An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on an Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. *Irish Veterinary Journal*, v. 62, n. 6, p. 1, 2009.
- DORES, M. T.; NÓBREGA, 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.
- DÜRR, S.; MÜLLER, B.; ALONSO, S. *et al.* Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, p. e2399, 2013.
- EL-SAYED, A.; EL-SHANNAT, S.; KAMEL, M. *et al.* Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. *Zoonoses and Public Health*, v. 63, n. 4, p. 251-264, 2016.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO MINAS GERAIS (EMATER). Programa queijo Minas artesanal. 2017. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299>. Acesso em 18/11/2017.

ESTEBAN, J.; ROBLES, P.; SOLEDAD JIMENEZ, M. *et al.* Pleuropulmonary infections caused by *Mycobacterium bovis*: a re-emerging disease. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 11, n. 10, p. 840-843, 2005.

ETCHECHOURY, I.; VALENCIA, G. E.; MORCILLO, N. *et al.* Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First Description of a Person-to-Person Transmission Case. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 6, p. 375-381, 2010.

FARIA, A.; SCHWARZ, D.; CARVALHO, I. *et al.* Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 7, p. 4111-4114, 2014.

FAVARO, L.; PENNA, A. L. B.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses—Application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, v. 41, n. 1, p. 37-48, 2015.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B. D.; ROSA, B. M. *et al.* 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, 2016.

FOOD SAFETY AUTHORITY. *Persistence of Mycobacterium bovis and Verocytotoxin Escherichia coli (VTEC) in UK-made raw cheeses*. 2013. Disponível em: <<https://www.food.gov.uk/science/research/foodborneillness/b12programme/B12projlist/fs231037b12008>>. Acesso em: 16 out. 2014.

FONSECA, M. Governo e produtores brigam por regulamentação do queijo mineiro. *Estado de Minas*, Belo Horizonte, 02 out. 2017. Caderno Agropecuário. 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>. Acesso em: 17 jan 2018.

FORGRAVE, R.; DONAGHY, J.; FISHER, A. *et al.* Optimization of modified Middlebrook 7H11 agar for isolation of *Mycobacterium bovis* from raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, v. 59, n. 4, p. 384-390, 2014.

FORGRAVE, R.; DONAGHY, J.; FISHER, A. *et al.* Survival kinetics of *Mycobacterium bovis* during manufacture and ripening of raw milk Cheddar and Caerphilly cheese produced on a laboratory-scale. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 5, p. 1457-1468, 2016.

FOX, P. F. *et al.* *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 658 p.

FOX, P. F. *et al.* *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3. ed. Madison: Academic Press, 2004. 1070 p.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.; RIBEIRO, M. G. *et al.* Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 1, p. 85, 2013.

FREITAS GUIMARÃES, F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B. *ET AL.* Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, 2013.

FUJIWARA, P. I.; OLEA-POPELKA, F. Editorial Commentary: Why It Is Important to Distinguish *Mycobacterium bovis* as a Causal Agent of Human Tuberculosis. *Clinical infectious diseases*, v. 63, n. 5, p. 602-603, 2016.

GAGGIÀ, F.; NIELSEN, D. S.; BIAVATI, B. *et al.* Intracellular pH of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to antimicrobial compounds monitored at the single cell level. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. S188-S192, 2010.

GALLIVAN, M.; SHAH, N.; FLOOD, J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003–2011. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 435, 2015.

GEAIRAIN, J. Virulence du *Mycobacterium tuberculosis* dans le fromage blanc. *Le Lait*, v. 30, n. 299-300, p. 608-612, 1950.

GIBSON, A. L.; HEWINSON, G.; GOODCHILD, T. *et al.* Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 431-434, 2004.

GINN, R.; PACKARD, V.; FOX, T. 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, 1985

GIRÃO, E. T. O novo queijo do Serro. *O Estado de São Paulo*, São Paulo, 11 jan. 2017. Caderno Paladar. Disponível em: < <http://paladar.estadao.com.br/noticias/comida,o-novo-queijo-do-serro,10000099530>>. Acesso em: 10 jan 2018.

GOODCHILD, A.; CLIFTON-HADLEY, R. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, v. 81, n. 1, p. 23-41, 2001.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 137-151, 1994.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D.; KANTOR, I. N. D. *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex*. 2a edição. World Health Organization, 1996. 23 p.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*, v. 81, n. 1, p. 71-77, 2001.

GRANT, I. R.; ROWE, M. T.; DUNDEE, L. *et al.* *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, v. 54, n. 1, p. 2-13, 2001.

GUEDES NETO, L. G. *Caracterização da produção artesanal e industrial de queijo de coalho em Pernambuco, de sua microbiota e avaliação das propriedades de suas bactérias ácido-láticas*. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

GUIMARÃES, J.; DE ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R. *ET AL.* Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

HAN, P. S.; ORTA, P.; KWON, D. I. *et al.* *Mycobacterium bovis* cervical lymphadenitis: A representative case and review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 79, n. 11, p. 1798-1801, 2015.

HANIFIAN, S. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ultra-filtered white cheese. *Letters in Applied Microbiology*, v. 58, n. 5, p. 466-471, 2014a.

HANIFIAN, S. Persistence of *Mycobacterium Avium Paratuberculosis* in Lighvan Cheese as Tracked by Propidium Monoazide qPCR and MGIT-MPN. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS OF MICROBIOLOGY, 2014b, Teerã.

HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. Destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. *Applied Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 494-495, 1965

HARRIS, N. B.; PAYEUR, J.; BRAVO, D. *et al.* Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 3, p. 1025-1028, 2007.

HASSI, M.; HAGGOUR, A.; EL MZIBRI, M. *et al.* Isolation and identification of a staphylococcal strain with an anti-mycobacterial activity and study of it's mode of action. *Annals of Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 651-656, 2007.

HELMY, N. M.; ABDEL-MOGHNEY, A.F.; ATIA, M. A. M. Evaluation of different PCR-based techniques in diagnosis of bovine tuberculosis in infected cattle lymph nodes. *American Journal of Microbiology and Technology*, v. 2, n. 5, p. 75-81, 2015.

HÖLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F. *et al.* Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 104, n. 11, p. 1354-1365, 2000.

HOLSINGER, V.; RAJKOWSKI, K.; STABEL, J. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties*, v. 16, p. 441-466, 1997.

HOORDE, K. V.; HEYNDRIKX, M.; VANDAMME, P. *et al.* Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 425-433, 2010.

HRUBANT, G. R.; RHODES, R. A. Death of fecal coliforms and *Mycobacterium paratuberculosis* during fermentation of corn and feedlot waste. *Biological Wastes*, v. 29, n. 2, p. 139-152, 1989.

HRUSKA, K.; SLANA, I.; KRALIK, P. *et al.* *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. *Veterinarni Medicina*, v. 56, n. 5, p. 226-230, 2011.

HSU, T.; HINGLEY-WILSON, S. M.; CHEN, B. *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung

interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 21, p. 12420-12425, 2003.

HUMBLET, M.-F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary Research*, v. 40, n. 5, p. 1-24, 2009.

HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LOIVUKENE, K. *et al.* Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 6, p. 1324-1332, 2006.

IKONOMOPOULOS, J.; PAVLIK, I.; BARTOS, M. *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8934-8936, 2005.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA). Queijo Minas Artesanal. 2017a. Disponível em: < http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3029-legislacao-certificacao-queijo-minas-artesanal> Acesso em 19/11/2017.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA). Estabelecimentos inseridos SISBI/POA - Queijaria. 2017b. Disponível em: < <http://www.ima.mg.gov.br/produtos-de-origem-animal2/estabelecimentos-inseridos-sisbipoa/1686>>. Acesso em 18/11/2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. 2016. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em 12/11/2017.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (INPI). Pedidos de indicação geográfica concedidos e em andamento. 2017. Disponível em: < <http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/pedidos-de-indicacao-geografica-no-brasil>>. Acesso em 19/11/2017.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Bruxelas: IDF, 1995. 8p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Whole milk: determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of midinfrared instruments. *IDF Standard 141C*. Bruxelas: IDF, 2000. 8p.

JALAVA, K.; JONES, J.; GOODCHILD, T. *et al.* No increase in human cases of *Mycobacterium bovis* disease despite resurgence of infections in cattle in the United Kingdom. *Epidemiology and Infection*, v. 135, n. 01, p. 40-45, 2007.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D. A. *Modern Food Microbiology*, p. 545-566, 2005.

JEONG, D.-W.; HEO, S.; RYU, S. *et al.* Genomic insights into the virulence and salt tolerance of *Staphylococcus equorum*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 5383, 2017.

JORDAO, L.; BLECK, C. K. E.; MAYORGA, L. *et al.* On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cellular Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 529-548, 2008.

- JORDAO JUNIOR, C.; LOPES, F.; DAVID, S. *et al.* Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 26, n. 6, p. 658-661, 2009.
- JORGE, K. D. S. G. *Identificação de Mycobacterium bovis em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica*. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- KAEVSKA, M.; HRUSKA, K. Mycobacteria in water, feedstocks and food: analysis of publications. *Veterinarni Medicina*, v. 55, n. 12, p. 571-580, 2010.
- KELLS, H.; LEAR, S. Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* in artificially infected milk. *Applied Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 234-236, 1960.
- KINDE, H.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A. *et al.* Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry. *Journal of Food Protection*, v. 70, n. 1, p. 47-52, 2007.
- KLANICOVA, B.; SLANA, I.; ROUBAL, P. *et al.* *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 157, n. 2, p. 150-155, 2012.
- KUMAR, P.; NATH, K.; RATH, B. *et al.* Visual format for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* in clinical samples using molecular beacons. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 11, n. 5, p. 430-438, 2009.
- LAMONT, E. A.; BANNANTINE, J. P.; ARMIÉN, A. *et al.* Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One*, v. 7, n. 1, p. e30648, 2012.
- LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K.; ASSOCIATION, A. P. H. (Ed). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 2001.
- LANIADO-LABORÍN, R.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; GARCÍA-ORTIZ, R. A. *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 27, p. 1-5, 2014.
- LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. *et al.* Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.
- LÉVESQUE, S.; DUFRESNE, P. J.; SOUALHINE, H. *et al.* A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0144878, 2015.
- LEVISON, M. E. *Mycobacterium bovis*: An underappreciated pathogen. *Current Infectious Disease Reports*, v. 10, n. 6, p. 444-446, 2008.
- LI, Y.-Q.; LIU, H.-F.; TIAN, Z.-L. *et al.* Diesel Pollution Biodegradation: Synergetic Effect of *Mycobacterium* and Filamentous Fungi. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 21, n. 3, p. 181-187, 2008.

- LICITRA, G. World wide traditional cheeses: Banned for business? *Dairy Science and Technology*, v. 90. P. 357-374, 2010.
- LIMA, C.; LIMA, L.; CERQUEIRA, M. *et al.* 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.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, v. 101, n. 1, p. 17-32, 2011.
- LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, n. 2, p. 115-131, 2003.
- LUIZ, L.; CASTRO, R.; SANDES, S. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA-Journal of Food*, v. 15, n. 1, p. 125-128, 2017.
- MACFADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2. ed. Baltimore: Willians e Wilkins, 1980. 527 p.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C.; FONSECA, L. M. *et al.* 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.
- MACUAMULE, C.; WIID, I.; VAN HELDEN, P. *et al.* Effect of milk fermentation by kefir grains and selected single strains of lactic acid bacteria on the survival of *Mycobacterium bovis* BCG. *International Journal of Food Microbiology*, v. 217, p. 170-176, 2016.
- MAHAIRAS, G. G.; SABO, P. J.; HICKEY, M. J. *et al.* Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 5, p. 1274-1282, 1996.
- MAJLOOR, C. J.; MAGIS-ESCURRA IBANEZ, C.; INGEN, J. V. *et al.* Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, 2011.
- MANDAL, S.; BRADSHAW, L.; ANDERSON, L. F. *et al.* Investigating transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1943-1950, 2011.
- MAPAS PARA COLORIR. Mapas de Minas Gerais. 2017. Disponível em: <<http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-minas-gerais.php>>. Acesso em 18/11/2017.
- MARCONDES, A. G.; MARIA DE LOURDES, M. S.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.
- MARIAM, S. H. Interaction between lactic acid bacteria and *Mycobacterium bovis* in Ethiopian fermented milk: insight into the fate of *M. bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 6, p. 1790-1792, 2009.

- MARIAM, S. H. Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within Laboratory-Fermented bovine milk. *BMC Research Notes*, v. 7, n. 1, p. 175, 2014.
- MATHEWS, F.; MACDONALD, D. W.; TAYLOR, G. M. *et al.* Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 273, n. 1584, p. 357-365, 2006.
- MAYRA-MAKINEN, A.; BIGRET, M. Industrial use and production of Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed). *Lactic Acid Bacteria*. Nova York : Marcel Dekker, 2004. 628 p.
- MCFADYEAN, J. Tubercle bacilli in cow's milk as a possible source of tuberculous disease in man. *Public Health*, v. 13, p. 814-825, 1901.
- MELO, C. B. D.; SÁ, M.E. P. D.; SOUZA, A. D. R. *et al.* Bacteria in dairy products in baggage of incoming travelers, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 11, p. 1933, 2014.
- MENESES, J. N. C. *Queijo Minas Artesanal: Dossiê Interpretativo*. Belo Horizonte: IPHAN, 2006. 139 p.
- MENEZES, S. S. M. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica da América Central*, v. 2, n. 47, p. 1-16, 2011.
- MERWE, M.; MICHEL, A. L. An investigation of the effects of secondary processing on *Mycobacterium* spp. in naturally infected game meat and organs. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 81, n. 3, p. 166-169, 2010.
- MEYERS, P. R.; BOURN, W. R.; STEYN, L. M. *et al.* Novel method for rapid measurement of growth of mycobacteria in detergent-free media. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 9, p. 2752-2754, 1998.
- MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3, p. 371-381, 2010.
- MICHEL, A. L.; GEOGHEGAN, C.; HLOKWE, T. *et al.* Longevity of *Mycobacterium bovis* in raw and traditional souring milk as a function of storage temperature and dose. *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0129926, 2015.
- MIGNARD, S.; PICHAT, C.; CARRET, G. *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 9, p. 1431-3, 2006.
- MILIÁN-SUAZO, F.; PÉREZ-GUERRERO, L.; ARRIAGA-DÍAZ, C. *et al.* Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 97, n. 1, p. 37-44, 2010.
- MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J. *et al.* IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 9, p. 3446-3452, 1996.
- MILLER, M.; OLEA-POPELKA, F. One Health in the shrinking world: Experiences with tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 263-268, 2013.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Decreto n. 42.645 de 2002. Aprova o regulamento da Lei 14.185, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 15 jun. 2002.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria n. 818 de 2006. Baixa o regulamento técnico de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, 12 dez. 2006.

MINAS GERAIS. Lei n. 19.492 de 2011. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte, 14 jan. 2011.

MINAS GERAIS. Lei n. 20.549 de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte, 19 dez. 2012.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria n. 1.736 de 2017. Dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 27 jul. 2017b.

MINAS GERAIS. Secretaria De Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Perfil da Agricultura Familiar de Minas Gerais. 2014. Disponível em: < <http://www.agricultura.mg.gov.br/images/files/Perfil%20da%20Agricultura%20Familiar%20v2.pdf> > Acesso em 18/11/2017.

MINAS GERAIS. Secretaria De Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Subsecretaria do Agronegócio. Bovinocultura Leite e Corte. 2017a. Disponível em: < http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Pecuaria/2017/Mar/bovinocultura_leite_corte_mar_2017.pdf > Acesso em 18/11/2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Desenvolvimento Agrário. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose de 05 out. 2006. Brasília, 2006.

MISHRA, A.; SINGHAL, A.; CHAUHAN, D. *et al.* Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5670-5678, 2005.

MODA, G.; DABORN, C.; GRANGE, J. *et al.* The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease*, v. 77, n. 2, p. 103-108, 1996.

MOLIVA, J. I.; TURNER, J.; TORRELLES, J. B. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: Why does BCG fail to protect against tuberculosis? *Vaccine*, v. 33, n. 39, p. 5035-5041, 2015.

MONTVILLE, T.; CHUNG, H. J.; CHIKINDAS, M. *et al.* Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 189-193, 1999.

MORICONI, P. R. *Pesquisa de Mycobacterium spp. em queijo Minas meia cura obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo*. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MORRIS, R.; PFEIFFER, D.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 153-177, 1994.

- MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013.
- MÜLLER, B.; DÜRR, S.; ALONSO, S. *et al.* Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 6, p. 899-908, 2013.
- MUNGAI, E. A.; BEHRAVESH, C. B.; GOULD, L. H. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 1, p. 119, 2015.
- MURPHY, E.; CHISTOV, Y.; HOPKINS, R. *et al.* Tuberculosis among Iron Age individuals from Tyva, South Siberia: palaeopathological and biomolecular findings. *Journal of Archaeological Science*, v. 36, n. 9, p. 2029-2038, 2009.
- MURRAY, C. J. L.; ORTBLAD, K. F.; GUINOVART, C. *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, v. 384, n. 9947, p. 1005-1070, 2014.
- MUSOKE, J.; HLOKWE, T.; MARCOTTY, T. *et al.* Spillover of *Mycobacterium bovis* from wildlife to livestock, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 448, 2015.
- NASR, S.; SAAD, N.; NASR, E. *ET AL.* The viability of *Mycobacterium bovis* in yoghurt and Kareish cheese. *Global Journal of Agriculture and Food Safety Sciences*, v. 1, n. 2, p. 261-269, 2014.
- NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. The effect of passaging in liquid media and storage on *Mycobacterium bovis*–BCG growth capacity and infectivity. *FEMS Microbiology Letters*, v. 243, n. 1, p. 81-86, 2005.
- NDE, C. W.; TOGHROL, F.; JANG, H.-J. *et al.* Toxicogenomic response of *Mycobacterium bovis* BCG to peracetic acid and a comparative analysis of the *M. bovis* BCG response to three oxidative disinfectants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 1, p. 277-304, 2011.
- NEILL, S.; SKUCE, R.; POLLOCK, J. Tuberculosis –new light from an old window. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2005.
- NETTO, M. M. O mercado central de Belo Horizonte: entre queijos e sabores. *Geograficidade*, v. 2, n. 1, p. 53-67, 2012.
- OLEA-POPELKA, F.; MUWONGE, A.; PERERA, A. *et al.* Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* – a call for action. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. e21-e25, 2017.
- OLIVEIRA, D. F. D.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C. *et al.* Caracterização físico-química de queijos Minas Artesanal produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. *Oikos: Revista Brasileira de Economia Doméstica*, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013.
- OLIVEIRA, L. G. *Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de Queijo Minas Artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG.* 2014. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, M. C. P. P. *Efeito protetor de Lactobacillus plantarum (B7) e L. rhamnosus (D1) de queijo Minas artesanal na infecção experimental por Escherichia coli EHEC e EIEC e o desenvolvimento de leite de búfala fermentado*. 2016. 83 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

O MINEIRO E O QUEIJO. Direção: Helvécio Ratton. Produção: Carlos Paulino e Simone Magalhães Matos. [S.I.]: Quimera, 2011. 1 DVD (72 min).

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, v. 76, p. 1-46, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Global Tuberculosis Report*. Genebra: World Health Organization, 2017. Disponível em: < http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 01 nov. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. *Disease distribution maps*. Paris: 2016. Disponível em: < https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap >. Acesso em: 22 nov. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees*. Paris: 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/en_document.php?numrec=3731603>. Acesso em: 16 ago. 2017.

ORNELAS, E. A. *Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra*. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PALMER, M.; WATERS, W.; WHIPPLE, D. Milk containing *Mycobacterium bovis* as a source of infection for white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*). *Tuberculosis*, v. 82, n. 4, p. 161-165, 2002.

PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; WATERS, W. *et al.* *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Veterinary Medicine International*, v. 2012, 2012.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P. *et al.* Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PARK, D.; QIN, H.; JAIN, S. *et al.* Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in patients coinfecting with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 11, p. 1343-1346, 2010.

PAVLIK, I.; FALKINHAM, J. O.; KAZDA, J. Environments Providing Favourable Conditions for the Multiplication and Transmission of Mycobacteria. In: KAZDA, J.; PAVLIK, I.; FALKINHAM, J. O. *et al.* (Ed). *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. Londres: Springer, 2009. 535 p.

PEÑUELAS-URQUIDES, K.; VILLARREAL-TREVIÑO, L.; SILVA-RAMÍREZ, B. *et al.* Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth: a correlation of the optical measurements with colony forming units. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 287-290, 2013.

PEREIRA-SUÁREZ, A. L.; ESTRADA-CHÁVEZ, Y.; ZÚÑIGA-ESTRADA, A. *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by PCR in Fresh Cheese from Local Markets in Hidalgo, Mexico. *Journal of Food Protection*, v. 77, n. 5, p. 849-852, 2014.

PÉREZ-LAGO, L.; NAVARRO, Y.; GARCÍA-DE-VIDEIRA, D. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Research in Veterinary Science*, v. 97, p. S94-S100, 2014.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios Rugai e Lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 32, p. 97-100, 1972.

PINTO, V. N. *O ouro brasileiro e o comércio anglo-português*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979. 346 p.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. D. L. F.; MARTINS, J. M. *ET AL.* 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, 2009.

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

PRASAD, H.; SINGHAL, A.; MISHRA, A. *et al.* Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. *Tuberculosis*, v. 85, n. 5, p. 421-428, 2005.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine *tuberculosis* 1888–1988: Conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, v. 99, n. 4, p. 357-399, 1988.

PRODUÇÃO de Queijo Minas Artesanal ganha reforço com o atendimento a 600 produtores. *Agência Minas Gerais*, Belo Horizonte, 03 mar 2017. Caderno Agropecuário. Disponível em: <<http://agenciaminas.mg.gov.br/noticia/producao-de-queijo-minas-artesanal-ganha-reforco-com-o-atendimento-a-600-produtores>> Acesso em: 14 jan. 2018.

PULLINGER, E. Examination of milk products for tubercle bacilli and *Brucella abortus*. *The Lancet*, v. 225, n. 5832, p. 1342-1344, 1935.

RAMDAS, K. E.; LYASHCHENKO, K. P.; GREENWALD, R. *et al.* *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 480, 2015.

RAMOS, J. M.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. *et al.* Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in milk from cows in northeastern Brazil. *Ciência Rural*, v. 46, n. 12, p. 2166-2169, 2016.

RAO, M.; STREUR, T. L.; ALDWELL, F. E. *et al.* Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology*, v. 147, n. 4, p. 1017-1024, 2001.

RASTOGI, N.; GOH, K. S.; CLAVEL-SÉRÈS, S. Stazyme, a mycobacteriolytic preparation from a *Staphylococcus* strain, is able to break the permeability barrier in multiple drug resistant

Mycobacterium avium. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 19, n. 4, p. 297-305, 1997.

RECORDISTAS no cadastro de produtores do Queijo Minas Artesanal. Notícias Sistema FAEMG, Belo Horizonte, 04 jul 2013. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/Noticia.aspx?Code=2907&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

REGASSA, A.; MEDHIN, G.; AMENI, G. Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active *tuberculosis* in central Ethiopia. *The Veterinary Journal*, v. 178, n. 1, p. 119-125, 2008.

RESENDE, M.; COSTA, H.; ANDRADE, E. *et al.* 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.

RIBEIRO, L. Queijos artesanais apurados disputam novos mercados. *Estado de Minas*, Belo Horizonte, 08 ago. 2016. Caderno de Economia. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2016/08/08/internas_economia,791891/queijos-artesanais-apurados-disputam-novos-mercados.shtml>. Acesso em: 17 jan 2018.

ROBBE-AUSTERMAN, S.; BRAVO, D. M.; HARRIS, B. Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 1, p. 74, 2013.

ROBERTS, T.; O'CONNOR, C.; NUÑEZ-GARCIA, J. *et al.* Unusual cluster of *Mycobacterium bovis* infection in cats. *The Veterinary Record*, v. 174, n. 13, p. 326, 2014.

ROBERTSON, R. E.; CERF, O.; CONDRON, R. J. *et al.* Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurised dairy products. *International Dairy Journal*, 2017.

ROCHA, A.; ELIAS, A. R.; SOBRAL, L. F. *et al.* Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis*, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2011.

ROCHA, B. B. *Ocorrência de Mycobacterium bovis em queijos coalho artesanais e fatores associados ao consumo de leite e derivados lácteos informais*. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RODWELL, T. C.; MOORE, M.; MOSER, K. S. *et al.* Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Tuberculosis*, 2008.

ROIG, P.; ORTI, A.; NAVARRO, V. *et al.* *Mycobacterium bovis* infections in HIV patients: Report of four cases in Spain. *European Journal of Internal Medicine*, v. 10, n. 1, p. 45-48, 1999.

ROUG, A.; PEREZ, A.; MAZET, J. A. *et al.* Comparison of intervention methods for reducing human exposure to *Mycobacterium bovis* through milk in pastoralist households of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 115, n. 3, p. 157-165, 2014.

ROWE, M. T.; DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, v. 61, n. 4, p. 317-326, 2008.

RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, n. 2, p. 77-109, 2006.

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*. 2015. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SALES, M.; FONSECA JR, A.; ORZIL, L. *et al.* Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, p. 4607-4616, 2014.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2010. 264 p.

SANT'ANNA, F. M.; ACURCIO, L. B.; ALVIM, L. B. *et al.* 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, n. 4, p. 592-601, 2017.

SAURET, J.; JOLIS, R.; AUSINA, V. *et al.* Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tubercle and Lung Disease*, v. 73, n. 6, p. 388-391, 1992.

SCOTT, C.; CAVANAUGH, J. S.; PRATT, R. *ET AL.* Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, 2006–2013. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 5, p. 594-601, 2016.

SEIXAS, V. N. C.; FÉLIX, M. R.; SILVA, G. M. D. *et al.* Characterization of Marajó's butter-type cheese made in two seasons of the year. *Ciência Rural*, v. 45, n. 4, p. 730-736, 2015.

SERRANO-MORENO, B. A.; ROMERO, T. A.; ARRIAGA, C. *et al.* High Frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in Colostra from Tuberculous Cattle Detected by Nested PCR. *Zoonoses and Public Health*, v. 55, n. 5, p. 258-266, 2008.

SEVERINO, N. S. A memória de um paladar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE HISTÓRIA CULTURAL, VI, 2012, Teresina. *Anais...* Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2012. p. 1-6.

SGARIONI, S. A.; HIRATA, R. D. C.; HIROYUKI HIRATA, M. *et al.* Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 707-711, 2014.

SHAH, N.; SINGHAL, A.; JAIN, A. *et al.* Occurrence of overlooked zoonotic tuberculosis: detection of *Mycobacterium bovis* in human cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1352-1358, 2006.

SILVA, J. G. *Identificação Molecular de Bactérias Ácido-láticas e Propriedades Probióticas In Vitro de Lactobacillus Spp. Isoladas de Queijo Minas Artesanal de Araxá, Minas Gerais*. 2015. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SILVA, M. R.; GUIMARÃES, M. D. C.; OLIVEIRA, V. M. D. *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex based on amplification and sequencing of the oxyR

pseudogene from stored Ziehl-Neelsen-stained sputum smears in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 1, p. 09-15, 2011.

SILVA, M. R.; ROCHA, A. D. S.; COSTA, R. R. D. *et al.* Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 321-327, 2013.

SILVA, M.R.; ROCHA, B. B.; SOUZA, G. N. D. *et al.* Ocorrência de *Mycobacterium bovis* em queijo Coalho na região de Parnaíba, Piauí - Brasil. In: XII CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2013, Porto Velho. *Anais...* Brasília: Embrapa, 2013.

SILVEIRA, G. B. Revisão do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/carne-bovina/anos-anteriores/revisao-do-programa-nacional-de-controle-e-erradicacao-e-da-brucelose-e-tuberculose-animal.pdf/view> >. Acesso em: 18 nov. 2016.

SMITH, R. M.; DROBNIEWSKI, F.; GIBSON, A. *et al.* *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 3, p. 539-541, 2004.

SPAHR, U.; SCHAFFROTH, K. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 9, p. 4199-4205, 2001.

SPAHR, U.; SCHAFFROTH, K. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk cheese. *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. 2002. Disponível em: < <http://www.paratuberculosis.info/proc7/> > Acesso em: 24 jan. 2016.

STARIKOFF, K. R. *Inativação de M. bovis durante a cura do queijo: definição de protocolo de estudo*. 2011. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.

STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M. *et al.* Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, 2016.

STOUT, J. E.; WOODS, C. W.; ALVAREZ, A. A. *et al.* *Mycobacterium bovis* peritonitis mimicking ovarian cancer in a young woman. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, n. 4, p. e14-e16, 2001.

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*, n. 358, p. 36-48, 2000.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 1334-1339, 2000.

SWEENEY, F. P.; COURTENAY, O.; UL-HASSAN, A. *et al.* Immunomagnetic recovery of *Mycobacterium bovis* from naturally infected environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 364-369, 2006.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, v. 40, n. 3, p. 722, 1976. TAYLOR, G. M.; WORTH, D. R.; PALMER,

S. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*, v. 3, p. 12-12, 2007.

TEKIPPE, E. M.; BURNHAM, C.-A. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 33, n. 12, p. 2163-2171, 2014.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2, p. 339-345, 2006.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: forgotten, but not gone. *The Lancet*, v. 369, n. 9569, p. 1236-1238, 2007.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; DE KANTOR, I. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention? [Editorial]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 14, n. 9, p. 1073-1074, 2010.

TODOROV, S.; BOTES, M.; GUIGAS, C. *et al.* Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 2, p. 465-477, 2008.

TORGERSON, P. R.; TORGERSON, D. J. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends in Microbiology*, v. 18, n. 2, p. 67-72, 2010.

TORRES-GONZALEZ, P.; SOBERANIS-RAMOS, O.; MARTINEZ-GAMBOA, A. *et al.* Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, p. e2177, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TORVINEN, E.; MEKLIN, T.; TORKKO, P. *et al.* Mycobacteria and Fungi in Moisture-Damaged Building Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 10, p. 6822-6824, 2006.

VAL, B. P.; VIDAL, E.; LÓPEZ-SORIA, S. *ET AL.* Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine*, v. 34, n. 7, p. 881-886, 2016.

VALVERDE, M. Queijo Minas Artesanal: ALMG votará PL que cria fundo indenizatório. *Diário do Comércio*, Belo Horizonte, 01 ago. 2017. Disponível em: <http://www.diariodocomercio.com.br/noticia.php?tit=queijo_minas_artesanal_almg_votara_pl_que_cria_fundo_indenizatorio&id=183696>. Acesso em 20 nov. 2017.

VAN BRANDT, L.; COUDIJZER, K.; HERMAN, L. *et al.* Survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, n. 5, p. 1252-1261, 2011.

VAN HELDEN, P. D.; VAN HELDEN, L. S.; HOAL, E. G. One world, one health. *EMBO Reports*, v. 14, n. 6, p. 497-501, 2013.

VANDAL, O. H.; NATHAN, C. F.; EHRT, S. Acid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 15, p. 4714-4721, 2009.

- VASEK, O.; LEBLANC, J. G.; FUSCO, A. *et al.* Chemical composition and microbial evaluation of Argentinean Corrientes cheese. *International Journal of Dairy Technology*, v. 61, n. 3, p. 222-228, 2008.
- VERAS, J. F.; DO CARMO, L. S.; TONG, L. C. *et al.* A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 4, p. 410-415, 2008.
- VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYENBERG, S. *et al.* A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, v. 50, p. 32-44, 2015.
- VIDHYASAGAR, V.; JEEVARATNAM, K. Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomedical Chromatography*, v. 27, n. 11, p. 1497-1502, 2013.
- VIEGAS, R.; SOUZA, M.; FIGUEIREDO, T. *et al.* Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2010.
- WALSH, A.; MORGAN, D. Bovine tuberculosis: Guidance on management of the public health consequences of tuberculosis in cattle and other animals (England). Disponível em: < https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/359464/Bovine_TB_Guidance_090814_FINAL.pdf > Acesso em: 15 nov, 2017.
- WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; DE LISLE, G. W. *et al.* Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 4, p. 471-480, 2002.
- WELBURN, S. C.; BEANGE, I.; DUCROTOY, M. J. *et al.* The neglected zoonoses—the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 5, p. 433-443, 2015.
- WINTHROP, K.; SCOTT, J.; BROWN, D. *et al.* Investigation of human contacts: a *Mycobacterium bovis* outbreak among cattle at a California dairy. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 9, n. 7, p. 809-813, 2005.
- YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K.-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, v. 63, p. 201-215, 2016.
- ZAHIR, I.; HOUARI, A.; IRAQUI, M. *et al.* *Aerococcus* sp. with an antimycobacterial effect. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 83, p. 19473-19480, 2013.
- ZANINI, M.; MOREIRA, E.; LOPES, M. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 45, n. 1-10, p. 473-479, 1998.
- ZARDEN, C. F. O.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. E. S. *et al.* *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *The Veterinary Record*, v. 172, n. 5, p. 130-130, 2013.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; TOTH, F. *et al.* Economics of Bovine Tuberculosis. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; GILSDORF, M. F. (Ed). *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. 2 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 68-83.

ORIGINAL
RESEARCH

Lactic acid bacteria isolated from Brazilian Minas artisanal cheeses and their *in vitro* antagonisms against *Mycobacterium bovis* BCG

LETÍCIA GOULART DE OLIVEIRA,^{1,*} GABRIELA OLIVEIRA E SILVA,¹ COSME DAMIÃO BARBOSA,² FELIPE MACHADO SANT'ANNA,¹ RENATA DIAS DE CASTRO,¹ NAIARA CHAVES FIGUEIREDO,¹ ÁLVARO CANTINI NUNES,³ ANDREY PEREIRA LAGE⁴ and MARCELO RESENDE DE SOUZA¹

¹Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, ²Departamento Alimentos, Faculdade de Farmácia, ³Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, and

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, 31270-901, Belo Horizonte, Brasil

The consumption of raw milk and its products is a risk factor associated with zoonotic tuberculosis. Lactic acid bacteria (LAB) show inhibitory activity against *Mycobacterium bovis*, the causative agent of tuberculosis. The aim of this study was to assess the *in vitro* antagonistic activity of LAB from Brazilian Minas artisanal cheese against *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). Nine LAB were tested against *M. bovis* BCG in five *in vitro* antagonistic assays. Four lactobacilli gave the best results in all the experiments. This could be due to their growth rate, acid and bacteriocin production. In conclusion, LAB are capable of inhibiting *M. bovis* BCG viability.

Keywords *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, Brazilian Minas artisanal cheese, Lactic acid bacteria, Inhibition.

INTRODUCTION

The consumption of unpasteurised milk and its products, especially cheese, is on the rise (Yoon *et al.* 2016). Consequently, many state agencies worldwide have introduced regulations for the production and commercialisation of safe raw milk dairy products. Even so, these products have been associated with a number of food-borne diseases, such as listeriosis, campylobacteriosis and zoonotic tuberculosis (Mungai *et al.* 2015; Verraes *et al.* 2015; Yoon *et al.* 2016). Zoonotic tuberculosis, caused mainly by oral ingestion of the pathogen *Mycobacterium bovis*, has been reported in different countries across the globe (Mülle *et al.* 2013) and has been considered an emerging infectious disease by some authors (Welburn *et al.* 2015; El-Sayed *et al.* 2016). The consumption of raw milk and its products is considered to be one of the main risk factors associated with this disease in humans (Forgrave *et al.* 2016).

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of beneficial endogenous microorganisms commonly found in raw milk and unpasteurised dairy products. They are capable of controlling the proliferation of pathogens and other undesired bacteria by producing mainly organic acids and bacteriocins, but also hydrogen peroxide, diacetyl, and acetoin (Klanicova *et al.* 2012; Yoon *et al.* 2016). It has been recognised that organic acids disrupt bacteria homeostasis, lowering their intracellular pH and compromising their cytoplasmic membrane (Macuamule *et al.* 2016). As for bacteriocins, a group of peptides with inhibitory properties (Rowe and Donaghy 2008), they act mainly as pore formers, causing a loss of permeability on the plasmatic membrane (Todorov *et al.* 2008). Several *in vitro* tests have demonstrated LAB inhibitory activity against slow- and fast-growing mycobacteria (Zahir *et al.* 2011; Vidhyasagar and Jeevaratnam 2013). Lactic acid bacteria have also been tested directly against mycobacteria in fermented

*Author for correspondence.
E-mail: leticiagoliveira@yahoo.com

products such as boza (Todorov *et al.* 2008), fermented milk (Mariam 2014; Michel *et al.* 2015; Macuamule *et al.* 2016), yoghurt, kefir, acidophilus milk (Van Brandt *et al.* 2011; Klanicova *et al.* 2012) and cheese (Forgrave *et al.* 2016). Although LAB have demonstrated antimicrobial activity against different species of *Mycobacterium* in these studies, their mode of action has yet to be fully elucidated.

Mycobacterium bovis is a pathogen responsible for tuberculosis principally in bovines and buffalo. Additionally, it can cause the disease in humans and other mammals. The main route of the infection in animals is by airborne contact. In humans, most cases are associated with the consumption of contaminated raw milk and dairy products (Rowe and Donaghy 2008; Mungai *et al.* 2015). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) is an attenuated bacterium used for human vaccines. Cattle are not vaccinated against bovine tuberculosis, since this compromises official diagnostic tests (Vordermeier *et al.* 2016). The control of this disease in Brazil is based on a test and slaughter strategy, whereby a bovine with a positive result for the tuberculin test is slaughtered (Barbieri *et al.* 2016; Ferreira Neto *et al.* 2016). As a result, *M. bovis* BCG would be impossible find in milk and other dairy products. Nevertheless, this attenuated bacterium has been used in experimental research as an alternative to *M. bovis* (Rao *et al.* 2001; Macuamule *et al.* 2016) as it is safer and still can predict the pathogen behaviour *in vitro* and in other environments, such as in dairy products.

Several studies have reported LAB isolated from Brazilian artisanal cheeses made from raw milk and some of these microorganisms have been tested against various pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. (Costa *et al.* 2013; Andrade *et al.* 2014; Silva 2016; Luiz *et al.* 2016; Sant'Anna *et al.* 2017). As for their activity against *M. bovis*, no LAB isolated from Brazilian raw milk cheeses has been tested *in vitro* and *in situ*.

This is relevant since bovine tuberculosis is endemic in Brazil and this zoonotic disease can be transmitted by the consumption of these dairy products (Barbieri *et al.* 2016; Ferreira Neto *et al.* 2016). Therefore, the aim of this study was to assess the *in vitro* antagonistic activity of LAB isolated from Brazilian Minas artisanal cheese and endogenous starter cultures against *M. bovis* BCG.

MATERIAL AND METHODS

Lactic acid bacteria and culture conditions

Nine LAB (Table 1) were isolated from Minas artisanal cheese or endogenous starter cultures used as cheese starter cultures, from three producing regions in the state of Minas Gerais, Brazil. Minas artisanal cheeses are made in seven official locations throughout the state. They are a traditional product, made on small farms, using raw milk, rennet and endogenous starter culture, which is whey collected from previously made cheeses.

Strains *Lactobacillus rhamnosus* D1C and *Lactobacillus paracasei* A1C and B7C were isolated from cheeses from Serra da Canastra (Costa *et al.* 2013; Andrade *et al.* 2014). *Pediococcus acidilactici* 26CV, *Lactobacillus plantarum* 1CV and 56CV were isolated from cheeses and endogenous starter cultures from Campo das Vertentes (Sant'Anna *et al.* 2017). Finally, strains *Lactobacillus brevis* E35A and *L. rhamnosus* A1A and A6A were isolated from cheeses from Araxá (Silva 2016; Luiz *et al.* 2016).

They had been tested *a priori* for their probiotic potential, based on their tolerance to biliary salts and artificial gastric juice, antimicrobial sensitivity, spot-on-lawn and co-culture antagonism, and production of hydrogen peroxide. From the 65 LAB isolated in these five assays, the best nine bacteria were then chosen for this experiment. They all gave promising results when compared with the other 56 LAB, which were not selected for this experiment.

Table 1 Lactic acid bacteria designation, species, origin and reference.

Designation	Species	Origin	Final inoculum concentration (log ₁₀ cfu/mL)	References
A1C	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Minas artisanal cheese	9.17	Costa <i>et al.</i> (2013) and Andrade <i>et al.</i> (2014)
B7C	<i>L. paracasei</i>	Minas artisanal cheese	9.66	
D1C	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Minas artisanal cheese	8.68	
1CV	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Endogenous starter culture	9.53	Sant'Anna <i>et al.</i> (2017)
56CV	<i>L. plantarum</i>	Minas artisanal cheese	9.3	
26CV	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Minas artisanal cheese	9.41	
A1A	<i>L. rhamnosus</i>	Minas artisanal cheese	9	Silva (2016) and Luiz <i>et al.</i> (2016)
A6A	<i>L. rhamnosus</i>	Minas artisanal cheese	9.11	
E35A	<i>Lactobacillus brevis</i>	Minas artisanal cheese	9.56	

The lactic acid bacteria samples were taxonomically identified according to their proteomic profile. For this, the matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis was carried out using a MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Billerica, MA, USA) following the manufacturer's instructions (TeKippe and Burnham 2014; Lévesque *et al.* 2015).

For each antagonism assay, LAB were grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck, Kenilworth, NJ, USA) twice at 37 °C for 24 h, and then inoculated on the specific media – 7H11 agar (Tagg *et al.* 1976), powdered skimmed milk (Macuamule *et al.* 2016), 7H9 broth or MRS broth (Hütt *et al.* 2006). These final inoculums were also diluted in peptone saline before being plated on MRS agar at 37 °C for 48 h for enumeration (Table 1).

***Mycobacterium bovis* BCG and culture conditions**

A sample of *M. bovis* BCG Monreau was donated by the Laboratório Nacional de Agropecuária in Middlebrook 7H9 broth. For the inoculum preparation, a 100 µL aliquot was transferred to 5 mL of 7H9 broth (Difco, Livonia, MI, USA), supplemented with 10% Middlebrook OADC enrichment (Difco), 0.5% sodium pyruvate (Neon, São Paulo, SP, Brazil), and 0.05% Tween 80 (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). It was then incubated at 37 °C for 5 days, when the bacteria reached the final inoculum concentration of 8.8 log₁₀ cfu/mL.

Escherichia coli strain ATCC 25922 was used in this study as a positive control for all antagonistic activity assays: spot-on-lawn antagonistic activity, antagonistic activity of LAB in fermented milk, antagonistic activity of LAB in 7H9 broth, and antagonistic activity of LAB supernatants. *Escherichia coli* was grown at 36 °C in BHI broth, as previously described (Tagg *et al.* 1976; Hütt *et al.* 2006; Macuamule *et al.* 2016).

Spot-on-lawn antagonistic activity

Lactic acid bacteria were previously tested for growth on 7H11 agar. As they were capable of forming colonies, 10 µL of each strain of LAB were placed in the middle of a glass Petri dish containing 7H11 agar and grown at 37 °C for 48 h, forming spots (Tagg *et al.* 1976). The spots were then inactivated by exposure to chloroform (Proquimios) for 30 min and under ultraviolet light for another 30 min. The inactivation procedure was carried out to demonstrate that there is no requirement for mutual contact between live LAB and *M. bovis* BCG in order to induce antagonism. A volume of 10 µL of *M. bovis* BCG at a concentration of 8.8 log₁₀ cfu/mL was added to 4 mL of semisolid (0.75%) 7H9 agar and plated on the surface of the Petri dishes containing the inactivated LAB spots. The plates were then incubated at 37 °C for 5 days. The inhibition haloes were then measured with a digital pachymeter (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, SP, Brazil).

Antagonistic activity of LAB in fermented milk

Milk was prepared by reconstituting 20 g of powdered skimmed milk (Itambé, Belo Horizonte, MG, Brazil) in 50 mL of sterilised distilled water. The product was then inoculated with 1% of *M. bovis* BCG (8.8 log₁₀ cfu/mL) and the same percentage of each of the LAB at their final inoculum concentration (Table 1) (Macuamule *et al.* 2016). The milk was then fermented for 5 days at 37 °C.

The powdered milk microbiological quality was previously assessed by counts of *Staphylococcus aureus* (Lancette and Tatini 2001), total and thermotolerant coliforms (Ginn *et al.* 1985), and for the presence of *Salmonella* spp. (Andrews *et al.* 2001).

Antagonistic activity of LAB in 7H9 broth

A volume of 100 µL of *M. bovis* BCG at a concentration of 8.8 log₁₀ cfu/mL and 100 µL of each of the LAB at their final inoculum concentration were added to 10 mL of 7H9 broth supplemented with 10% Middlebrook OADC enrichment, 0.5% sodium pyruvate, and 0.05% Tween 80. After 5 days at 37 °C, the strains were plated on MRS agar and 7H11 agar enriched with erythromycin estolate (Ache, Guarulhos, SP, Brazil) at 4%. All the LAB had demonstrated, in previous studies (Costa *et al.* 2013; Andrade *et al.* 2014; Silva 2016; Luiz *et al.* 2016; Sant'Anna *et al.* 2017), their susceptibility against erythromycin at that concentration.

Antagonistic activity of LAB supernatants

Each LAB was cultivated at 37 °C in 5 mL of MRS broth. After 24 h, the broths were centrifuged (5000 g for 15 min) and their supernatants were autoclaved at 121 °C for 15 min (Macuamule *et al.* 2016) and, in parallel, filtered through 0.22 µm pore syringe filters. A volume of 4 mL of each of the supernatants was then collected and added to 4 mL of 7H9 broth supplemented with 10% Middlebrook OADC enrichment, 0.5% sodium pyruvate, and 0.05% Tween 80. An inoculum of 1% of *M. bovis* BCG at a concentration of 8.8 log₁₀ cfu/mL was added to each mixture of MRS and 7H9 broth and incubated at 37 °C for 5 days (Hütt *et al.* 2006).

Bacterial enumerations

After the 5-day incubation period for all the antagonism assays, counts of LAB were performed on MRS agar (MacFaddin 1980) and counts of *M. bovis* BCG were performed on 7H11 agar (Difco) supplemented with 10% Middlebrook OADC enrichment, 0.5% sodium pyruvate, and 0.05% Tween 80 (Forgrave *et al.* 2014). In the assays where LAB were viable (fermented milk assay and 7H9 concomitant growth assay), the 7H11 agar was also supplemented with erythromycin.

The pH (mPA-210, Piracicaba, SP, Brazil) was measured solely in the controls, in order not to contaminate the pH

meter with *M. bovis* BCG, despite its attenuated pathogenic profile.

The antagonism assays were performed in technical triplicate at two independent biological repetitions. Since the Gaussian distribution was not met on all the assays, the nonparametric Kruskal–Wallis test was used to determine whether there was a significant difference between the groups (significance level of 95%). The Bonferroni multiple comparison *post hoc* test was then applied when comparing the means of each treatment. All statistical analyses were run on the GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Spot-on-lawn antagonistic activity

The spot-on-lawn assay did not provide evidence of any LAB antagonistic activity against *M. bovis* BCG. Although all LAB grew and formed a spot on the 7H11 agar, the mycobacterium was able to form tapestry-like colonies over these LAB spots. As a result, no inhibition halo was observed around these spots. The 7H11 agar may have inhibited the reduction of pH or the production of bacteriocin by the LAB. Both mechanisms have been demonstrated to be effective against the viability of *M. bovis* BCG and other mycobacteria (Carroll *et al.* 2010; Gaggia *et al.* 2010). The lack of acidification of the media is probably due to its pyruvate constitution, since LAB use this sugar as a source of carbohydrate, which enables them to multiply. This fermentation process results in the formation of lactate, which does not diminish the pH of the environment (Liu 2003). As for the likely absence of bacteriocins, once again, the media used may have played a role in it. It is known that in order to produce these peptides, LAB must encounter a series of optimal conditions such as pH, the presence of certain carbohydrates and organic nitrogen, and even high growth rates (Macuamule *et al.* 2016). Those conditions, which are intrinsically connected, were probably not met, which may have resulted in a lack of bacteriocins. Therefore, *M. bovis* BCG was capable of growing freely in this assay.

Antagonistic activity of LAB in fermented milk

As seen in Table 2, the *M. bovis* BCG count was reduced after 5 days when grown concomitantly on skimmed milk with six of the LAB tested (Table 1). It should be noted that, as for the powdered milk microbiological quality, there were no counts of *S. aureus*, total or thermotolerant coliforms, and an absence of *Salmonella* spp.

Mycobacterium bovis BCG was able to survive at counts of 3.1 log₁₀ cfu/mL in skimmed milk when not in contact with other bacteria, even after 5 days. Similar counts have been reported in milk naturally infected with this microorganism (Kells and Lear 1960; Zanini *et al.* 1998). The same results were reported in different experiments, when

Table 2 Counts of *Mycobacterium bovis* BCG in 7H11 and LAB in MRS agar after 5 days of concomitant growth in fermented skimmed milk.

	<i>M. bovis</i> BCG (log ₁₀ cfu/mL)	LAB (log ₁₀ cfu/mL)	Fermented skimmed milk pH
<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> A1C	0.47*	8.25	3.99
<i>L. paracasei</i> B7C	0.7	8.63	5.09
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> D1C	0.35*	8.96	3.77
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> 1CV	0*	7.73	4.19
<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> 26CV	1.13	9.08	4.86
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	7.38	4.15
<i>L. rhamnosus</i> A1A	0*	9.39	3.78
<i>L. rhamnosus</i> A6A	0.16*	8.06	3.77
<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> E35A	1.13	8.16	5.14
Control	3.1	–	6.17

BCG, bacillus Calmette–Guérin; LAB, lactic acid bacteria.

**P* < 0.05 (Kruskal–Wallis test) compared with control.

M. bovis and *M. bovis* BCG were inoculated on pasteurised milk and survived after 7 days and 84 h, respectively (Mariam 2009; Macuamule *et al.* 2016). Also, the sole presence of *M. bovis* BCG did not interfere with the pH of the milk. The same result was found when *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was cultivated individually in soured milk products (Klanicova *et al.* 2012).

The strains *L. paracasei* A1C, *L. plantarum* 1CV and 56CV and *L. rhamnosus* D1C, A1A and A6A significantly reduced the counts of *M. bovis* BCG in fermented milk after 5 days of fermentation. Among LAB, *Lactobacillus* is one of the genera known for its capacity to produce organic acids and bacteriocins, which are deleterious to several microorganisms. Although the exact inhibition mechanism could not be assessed, the considerable decline of the attenuated pathogen could have been associated with a pH lower than 4.19. It has been long known that high concentrations of organic acids, including lactic acid, may result in complete inhibition of mycobacterial growth, which are considered to be acid resistant microorganisms (Michel *et al.* 2015).

Lactobacillus plantarum 1CV, *L. plantarum* 56CV, and *L. rhamnosus* A1A strains were shown to be the most efficient in the fermented milk assay, since they were able to completely inhibit *M. bovis* BCG. The pH of their fermented milks ranged from 3.78 to 4.19, and this wide range could indicate that other antimicrobial compounds might have taken part in the process.

Only three LAB, *L. paracasei* B7C, *P. acidilactici* 26CV and *L. brevis* E35A were not capable of inhibiting the

attenuated pathogen when compared with the control. It should be noted that their counts remained high, from 8.16 to 9.08 log₁₀ cfu/mL, during and even after milk fermentation. On the other hand, the pH of these fermented milks varied from 4.86 to 5.14, achieving the highest values compared with the other LAB used in the same assay. Therefore, the acidity of fermented milk must have played an important part in the survival of *M. bovis* BCG, since this bacteria can survive at pH values ranging from 4.6 to 7.2 (Rao *et al.* 2001). It should also be noted that although there was a decrease in the concentration of the attenuated pathogen, this bacterium was able to survive even when competing with these three LAB for the same milk nutrients, which could indicate its survival ability in commercial products.

Lactobacillus paracasei A1C and *L. paracasei* B7C presented opposite effects on the survival of *M. bovis* BCG; strain A1C was capable of significantly diminishing the counts of the mycobacterium, whilst strain B7C could not reduce its counts. This may suggest that the effects each one can have on the survival of *M. bovis* BCG could be intrinsic to each bacterial strain or sample.

Several studies have reported the survival of *M. bovis*, *M. bovis* BCG and other similar mycobacteria in fermented products, especially those containing bacteria from the genus *Lactobacillus*.

In an Ethiopian study, two nonidentified species of *Lactobacillus*, isolated from traditional soured milk, were fermented concomitantly with *M. bovis* in heated milk for 15 days. The strain that was solely cultivated with the pathogen could not significantly decrease the counts of *M. bovis*, and the other, together with a mixture of mesophilic LAB, was responsible for the nondetection of the pathogen (Mariam 2009). The same author, without specifying the LAB, demonstrated that sour milk made from raw milk eradicated *Mycobacterium tuberculosis* after 7 days (Mariam 2014). Also using raw milk, in a South African study, *M. bovis* was viable for 2 weeks at a temperature of 22 °C. However, when milk was fermented at 33 °C, similar to our study, the pathogen was absent after 3 days (Michel *et al.* 2015). In another study from South Africa, *Lactobacillus casei* and *L. paracasei* were also capable of eliminating *M. bovis* BCG after 60 h in fermented milk (Macuamule *et al.* 2016).

In a Belgian assay, MAP was still viable after 6 weeks in fermented milk (final pH was 3.8) made from a combination of *L. casei* and *L. rhamnosus*. The counts of the pathogen showed a 1.8–2.2 log₁₀ cfu/mL reduction after that period, according to the MAP strain tested. However, the decline of MAP was not significant when compared with the control sample (Van Brandt *et al.* 2011), just as seen in our experiment with strains *L. paracasei* B7C, *P. acidilactici* 26CV, and *L. brevis* E35A. It should be noted that, although some results were compatible with our results, MAP is known for

surviving under unfavourable conditions, even surpassing the ability of *M. bovis* to endure (Van Brandt *et al.* 2011).

Lactobacillus bulgaricus and *Lactobacillus acidophilus*, associated with other LAB, were responsible for a slight decrease in the counts of MAP in yoghurt and fermented milk in an experiment from Czechia. In the same study, however, *Lactobacillus helveticus* alone was able to significantly reduce the counts of the pathogen during the fermentation. The authors have stated that, just as in our study, the pH level played a critical role in the survival of MAP and when it reached values below 4.0, the chances of MAP inactivation were higher (Klanicová *et al.* 2012).

Antagonistic activity of LAB in 7H9 broth

Table 3 shows the results of *M. bovis* BCG and LAB grown concomitantly in 7H9 broth for 5 days. When compared with the counts of the attenuated pathogen on the control (5.6 log₁₀ cfu/mL), *M. bovis* BCG were significantly inhibited by the presence of all LAB.

No data regarding the growth of LAB in 7H9 broth have been found in the scientific literature. However, it could be stated that these microorganisms were capable of multiplying in the media, since their counts, after 5 days at 37 °C, varied from 5.47 to 7.04 log₁₀ cfu/mL. Even though LAB had grown to these numbers, they were not capable of acidifying the broth. This was, once again, probably due to the pyruvate constitution of the media (Liu 2003). These results reinforce the concept that, even though the acidity of the media might be responsible for a decrease in *M. bovis* BCG counts, other factors could also lead to the reduction of this microorganism, as seen in this assay.

Table 3 Counts of *Mycobacterium bovis* BCG in 7H11 and LAB in MRS agar after 5 days of concomitant growth in 7H9 broth.

	<i>M. bovis</i> BCG (log ₁₀ cfu/mL)	LAB (log ₁₀ cfu/mL)	7H9 broth pH
<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> A1C	1.13*	6.39	6.66
<i>L. paracasei</i> B7C	0*	6.2	6.56
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> D1C	0.56*	6.85	6.49
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> 1CV	0.87*	6.92	6.49
<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> 26CV	1.13*	7.04	6.49
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	6.98	6.42
<i>L. rhamnosus</i> A1A	1.13*	5.47	6.5
<i>L. rhamnosus</i> A6A	1.69*	6.39	6.57
<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> E35A	1.13*	6.23	6.51
Control	5.6	–	6.66

BCG, bacillus Calmette-Guérin; LAB, lactic acid bacteria.

**P* < 0.05 (Kruskal–Wallis test) compared with control.

The main hypothesis for the significant reduction of *M. bovis* BCG in this assay is their fastidiousness. Although the media used, 7H9 broth, is specific for mycobacterial growth, their slow growth rate may have established a nutritional disadvantage. Since LAB cultures have faster growth, they could have simply depleted the nutrients in the media, and so the slow-growing mycobacteria had fewer resources. Competition for nutrients between *M. bovis* and LAB has been reported by other authors, who stated that this can diminish the growth of the pathogen (Michel *et al.* 2015; Verraes *et al.* 2015; Forgrave *et al.* 2016).

Antagonistic activity of LAB supernatants

As shown in Table 4, LAB sterilised supernatants were able to significantly reduce the counts of *M. bovis* BCG for almost all strains tested.

Except for the strains *L. rhamnosus* A1A and *L. brevis* E35A, all other tested LAB supernatants were capable of reducing the counts of *M. bovis* BCG in both assays when compared with the control. This could be due to the presence of organic acids or the production of bacteriocins by the LAB. Mycobacteria are known for their resistance to low pH due to their plasma membrane, which is thicker and enables clump formation, enhancing cell protection (Rua-Domenech 2006). This cell envelope is also capable of ejecting H⁺ protons when these are in high concentrations, hence increasing their survival (Rao *et al.* 2001). In this assay, however, the significant count reductions were mainly associated with the lowest pH values. Many authors have demonstrated that when the pH of the environment is lower

than 4.5, mycobacteria survival may be compromised (Michel *et al.* 2015; Forgrave *et al.* 2016). Therefore, the acidity of the supernatants could have acted directly against the attenuated pathogen, lowering its counts after 5 days in both broths combined. Since some bacteriocins in particular give better results at a lower pH, the high acidity could have also indirectly enhanced the *M. bovis* BCG inhibition (Carroll *et al.* 2010). In this assay, if the pH was not as low as 4.2, then the presence of bacteriocins and other antimicrobial agents must also be considered to explain the *M. bovis* BCG inhibition.

It should be noted that, even when the test was conducted with the autoclaved supernatant, there was a decrease in the counts of the attenuated pathogen. This might suggest that, if the inhibition was bacteriocin-associated, these peptides were, in this case, thermostable. The presence of the bacteriocins can be corroborated by the assay previously performed on the 7H9 media, when *M. bovis* BCG and LAB were grown together. Since there was no acidification of the media and yet the attenuated pathogen showed smaller counts, other factors, such as the presence of bacteriocins, must have influenced the lowest *M. bovis* BCG counts. It can also be observed that, in the case of the supernatants, there was no competition for the nutrients present in the 7H9 broth, since it was added to sterile supernatants. This can be corroborated by the fact that, as reported by Macua-mule *et al.* (2016), direct interaction between the pathogen and the inhibitory microorganisms is not mandatory in order to induce an antimicrobial effect. Despite the different media, MAP added to already fermented milk reduced its viability, especially when the pH was below 4.0 (Kianicova *et al.* 2012). This reinforces the hypothesis that the decline in the viability of *M. bovis* BCG was due to the inhibitory effect of the LAB isolated from Minas artisanal cheeses and their starter culture.

A similar assay to ours was performed with *M. tuberculosis*, MAP and *Mycobacterium kansasii* in 7H9 broth. However, instead of supernatants, two different bacteriocins, nisin and lacticin, were tested. Although in this study all trials were performed at pH 7, the mycobacteria showed significant susceptibility to both bacteriocins tested (Carroll *et al.* 2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* had also been tested against bacteriocins from two different strains of *L. plantarum*, likewise isolated from cheese. Both bacteriocins showed inhibitory activity against the pathogen in MRS broth (Gaggia *et al.* 2010). Lactic acid bacterial bacteriocins were also effective against *M. tuberculosis* in two different *in vitro* tests (Todorov *et al.* 2008) and, under similar conditions, against *Mycobacterium smegmatis* (Zahir *et al.* 2011; Vidhyasagar and Jeevaratnam 2013).

Lactobacillus rhamnosus A1A was able to significantly diminish the counts of the attenuated pathogen with the filtered supernatant alone. Since the autoclaved supernatant did not give satisfactory results, the component causing the

Table 4 Counts of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in 7H11 after 5 days of growth on filtered or autoclaved supernatant (7H9 and MRS) in association with lactic acid bacteria.

	Autoclaved supernatant (log ₁₀ cfu/mL)	Filtered supernatant (log ₁₀ cfu/mL)	Supernatant pH
<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> A1C	0.34*	0*	4.34
<i>L. paracasei</i> B7C	0*	0.*	4.27
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> D1C	0.97*	0.9*	4.29
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> 1CV	0.41*	0.38*	4.18
<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> 26CV	0*	0.5*	4.3
<i>L. plantarum</i> 56CV	0*	0*	4.1
<i>L. rhamnosus</i> A1A	1.05	0.56*	4.25
<i>L. rhamnosus</i> A6A	0.16*	0.2*	4.24
<i>Lactobacillus brevis</i> E35A	2.26	2.45	5.07
Control	6.98	6.4	

*P < 0.05 (Kruskal–Wallis test) compared with control.

inhibition was thermolabile and did not resist the high temperature and high pressure of the autoclave.

As for *L. brevis* E35A, both supernatants were not capable of inhibiting *M. bovis* BCG growth. Once again, the pH achieved by this strain was the highest when compared with the other LAB. The same result was observed in the milk fermentation assay, when the same microorganism could not reduce the counts of the attenuated pathogen and, as in this assay, could not lower the pH of milk below 5.0.

CONCLUSIONS

According to the results of all the assays, LAB or substances produced by them are capable of inhibiting or completely suppressing *M. bovis* BCG growth in different situations. Although the main inhibition mechanism was not elucidated, it is clear that pH plays an important role in this. Nevertheless, the presence of bacteriocins can also be inferred, especially in the assays where the pH remained close to neutral.

Each LAB demonstrated a different inhibition pattern when tested against the attenuated pathogen. This could be due to their own characteristics such as growth rate, acid production and bacteriocin production in the different media tested (skimmed milk, 7H9 broth or MRS broth).

Although classifying the LAB was not the main goal of this study, *L. paracasei* A1C, *L. rhamnosus* D1C, *L. plantarum* 1CV and *L. plantarum* 56CV demonstrated better antagonistic activity in all the assays. These microorganisms could be further studied for their inhibitory properties against *M. bovis*, their industrial use and their probiotic characteristics. Eventually, they could be used to manufacture safer dairy products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Laboratórios Nacionais Agropecuários – Minas Gerais for providing the *M. bovis* BCG strain. This study was supported with funds from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Andrade C, Souza M, Penna C, Acurcio L, Sant'Anna F, Castro R and Oliveira D (2014) In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **66** 1592–1600.
- Andrews W H, Flowers R S, Silliker J and Bailey J S (2001) Salmonella. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th edn, pp. 357–380. Downes F P, Ito K and American Public Health Association, eds. Washington, DC: American Public Health Association.
- Barbieri J M, Oliveira L F, Dorneles E M S, Mota A L A A, Gonçalves V S P, Mahuf P P, Ferreira Neto J S, Ferreira F, Dias R A and Telles E O (2016) Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. *Semina. Ciências Agrárias* **37** 3531–3548.
- Carroll J, Draper L A, O'Connor P M, Coffey A, Hill C, Ross R P, Cotter P D and O'Mahony J (2010) Comparison of the activities of the lantibiotics nisin and lacticin 3147 against clinically significant mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36** 132–136.
- Costa H, Souza M, Acúrcio L, Cunha A, Resende M and Nunes A (2013) Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **65** 1858–1866.
- El-Sayed A, El-Shannat S, Kamel M, Castañeda-Vazquez M A and Castañeda-Vazquez H (2016) Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. *Zoonoses and Public Health* **63** 251–264.
- Ferreira Neto J S, Silveira G B, Rosa B M, Gonçalves V S P, Grisi-Filho J H H, Amaku M, Dias R A, Ferreira F, Heinemann M B and Telles E O (2016) Analysis of 15 years of the national program for the control and eradication of animal brucellosis and tuberculosis, Brazil. *Semina. Ciências Agrárias* **37** 3385–3402.
- Forgrave R, Donaghy J, Fisher A and Rowe M (2014) Optimization of modified Middlebrook 7H11 agar for isolation of *Mycobacterium bovis* from raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology* **59** 384–390.
- Forgrave R, Donaghy J, Fisher A and Rowe M (2016) Survival kinetics of *Mycobacterium bovis* during manufacture and ripening of raw milk Cheddar and Caerphilly cheese produced on a laboratory-scale. *Journal of Applied Microbiology* **121** 1457–1468.
- Gaggia F, Nielsen D S, Biavati B and Siegmundfeldt H (2010) Intracellular pH of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis following exposure to antimicrobial compounds monitored at the single cell level. *International Journal of Food Microbiology* **141** S188–S192.
- Ginn R, Packard V and Fox T (1985) Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* **69** 527–531.
- Hütt P, Shechetova J, Loivukene K, Kullisaar T and Mikelsaar M (2006) Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology* **100** 1324–1332.
- Kells H and Lear S (1960) Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* in artificially infected milk. *Applied Microbiology* **8** 234–236.
- Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I and Kralik P (2012) *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology* **157** 150–155.
- Lancette G A and Tatini S R (2001) *Staphylococcus aureus*. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th edn, pp. 357–380. Downes F P, Ito K and American Public Health Association, eds. Washington, DC: American Public Health Association.
- Lévesque S, Dufresne P J, Soualhine H, Domingo M C, Bekal S, Lefebvre B and Tremblay C (2015) A side by side comparison of Bruker

- Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS ONE* 10 e0144878.
- Liu S-Q (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 83 115–131.
- Luiz L, Castro R, Sandes S, Silva J, Oliveira L, Sales G, Nunes A and Souza M (2016) Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA-Journal of Food* 15 125–128.
- MacFaddin J F (1980) *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd edn. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Macuamule C, Wiid I, Van Helden P, Tanner M and Withuhn R (2016) Effect of milk fermentation by kefir grains and selected single strains of lactic acid bacteria on the survival of *Mycobacterium bovis* BCG. *International Journal of Food Microbiology* 217 170–176.
- Mariam S H (2009) Interaction between lactic acid bacteria and *Mycobacterium bovis* in Ethiopian fermented milk: insight into the fate of *M. bovis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 1790–1792.
- Mariam S H (2014) Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within laboratory-fermented bovine milk. *BMC Research Notes* 7 175.
- Michel A L, Geoghegan C, Hlokw T, Raseleka K, Getz W M and Marcotty T (2015) Longevity of *Mycobacterium bovis* in raw and traditional souring milk as a function of storage temperature and dose. *PLoS ONE* 10 e0129926.
- Mülle B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C J, Parsons S D, Van Helden P D and Zinsstag J (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 19 899.
- Mungai E A, Behravesh C B and Gould L H (2015) Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. *Emerging Infectious Diseases* 21 119.
- Rao M, Streur T L, Aldwell F E and Cook G M (2001) Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiology* 147 1017–1024.
- Rowe M T and Donaghy J (2008) *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 61 317–326.
- Rua-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86 77–109.
- Sant'Anna F M, Acurcio L B, Alvim L B, Castro R D, Oliveira L G, Silva A M, Nunes A C, Nicoli J R and Souza M R (2017) 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* 70 592–601.
- Silva J G (2016) *Identificação Molecular de Bactérias Ácido-Láticas e Propriedades Probióticas In Vitro de Lactobacillus Spp. Isoladas de Queijo Minas Artesanal de Araxá, Minas Gerais*. Master's Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.
- Tagg J R, Dajani A S and Wannamaker L W (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40 722.
- TeKippe E M and Burnham C A (2014) Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 33 2163–2171.
- Todorov S, Bote M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsmann M, Holzapfel W H and Dicks L (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104 465–477.
- Van Brandt L, Coudijzer K, Herman L, Michiels C, Hendrickx M and Vlaemynck G (2011) Survival of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. *Journal of Applied Microbiology* 110 1252–1261.
- Veraes C, Vlaemynck G, Van Weyenberg S, De Zutter L, Daube G, Sindic M, Uyttendaele M and Herman L (2015) A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal* 50 32–44.
- Vidhyasagar V and Jeevaratnam K (2013) Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomedical Chromatography* 27 1497–1502.
- Vordermeier H M, Jones G J, Buddle B M, Hewinson R G and Villarreal-Ramos B (2016) Bovine tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. *Annual Review of Animal Biosciences* 4 87–109.
- Welburn S C, Beange I, Ducrotoy M J and Okello A L (2015) The neglected zoonoses – the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection* 21 433–443.
- Yoon Y, Lee S and Choi K-H (2016) Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 63 201–215.
- Zahir I, Houari A, Iraqi M and Ibsouda S (2011) *Aerococcus* sp. with an antimycobacterial effect. *African Journal of Biotechnology* 10 19473–19480.
- Zanini M, Moreira E, Lopes M, Mota P and Salas C (1998) Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. *Zoonoses and Public Health* 45 473–479.