

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

**André Almeida Santos Duch**

**ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DE *Brucella* spp. EM PROPRIEDADES  
PRODUTORAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL NA MICRORREGIÃO DO  
SERRO - MINAS GERAIS**

**Juiz de Fora – MG**

**2015**

**André Almeida Santos Duch**

ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DE *Brucella* spp. EM PROPRIEDADES  
PRODUTORAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL NA MICRORREGIÃO DO  
SERRO – MINAS GERAIS

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza

Juiz de Fora – MG, 2015

Duch, André Almeida Santos.

ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DE *Brucella* spp. EM PROPRIEDADES  
PRODUTORAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL NA MICRORREGIÃO DO SERRO  
- MINAS GERAIS / André Almeida Santos Duch. -- 2015.  
62 f. : il.

Orientador: Márcio Roberto Silva

Coorientador: Guilherme Nunes de Souza

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal  
de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,  
2015.

1. *Brucella abortus*. 2. Brucelose humana. 3. zoonose. 4.  
PCR. 5. PNCEBT. I. Silva, Márcio Roberto, orient. II.  
Souza, Guilherme Nunes de , coorient. III. Título.



Mestrado Profissional  
em Ciência e Tecnologia  
do Leite e Derivados



Embrapa  
Gado de Leite



Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

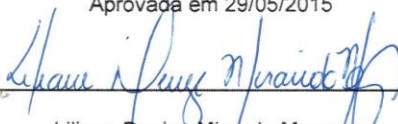
Estimativa da prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de queijo  
minas artesanal da microrregião do Serro – MG

André Almeida Santos Duch

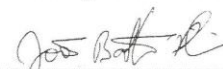
ORIENTADOR (A): Marcio Roberto Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,  
da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título  
de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 29/05/2015

  
\_\_\_\_\_  
Liliane Denize Miranda Menezes

  
\_\_\_\_\_  
Vanessa Aglaê Martins Teodoro

  
\_\_\_\_\_  
João Batista Ribeiro

  
\_\_\_\_\_  
Marcio Roberto Silva

Secretaria de Pós-Graduação  
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados  
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário  
CEP 36036-330 – Juiz de Fora – MG, Telefone (32) 2102-3808, e-mail: [mestrado.leite@ufjf.edu.br](mailto:mestrado.leite@ufjf.edu.br).

À minha esposa, **Anna Catalina Duch de Almeida**,  
pelo companheirismo, amor e sabedoria em entender  
os meus momentos de ausência, ao meu filho,  
**Rafael Duch Almeida Santos**, pelo amor incondicional  
e alegria em todos os momentos.

*Dedico*

## **Agradecimento**

À minha família, especialmente à minha **esposa, filho, mãe, pai e irmãos** pelo amor, carinho e apoio incondicional em mais essa etapa de minha vida. Vocês são o incentivo dessa conquista.

À **Embrapa Gado de Leite** por viabilizar financeiramente e tecnicamente minha formação acadêmica (mestrado).

Ao **Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)**, pela sabedoria em reconhecer a importância do desenvolvimento desse trabalho, apoio e esforços realizados para suprir a minha ausência.

À **Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF**, à **Embrapa Gado de Leite** e ao **Instituto de Laticínios Cândido Tostes** pelos ensinamentos passados.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Márcio Roberto Silva**, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, pela paciência, amizade, “puxões de orelha” e orientação durante toda a caminhada acadêmica e, especialmente, por acreditar que nosso projeto pudesse ser concretizado e dar os resultados esperados.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Guilherme Souza Nunes**, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, pelos ensinamentos que ultrapassaram a sala de aula, ensinamentos para a vida. Eternamente grato.

A todos os **professores** do programa de pós-graduação pela socialização, construção do conhecimento e dedicação profissional.

Aos **funcionários do LANAGRO – Pedro Leopoldo**, em especial ao **Dr. Antônio Augusto Fonseca Junior**, pelo excelente trabalho desenvolvido, contribuindo para o desenvolvimento do estudo. Sem vocês essa conquista não seria possível.

Aos componentes da **banca examinadora**, por se dedicarem em contribuir intelectualmente para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos, **Rômulo e Leticia**, pela amizade, companheirismo e troca de conhecimento para o melhor desenvolvimento do trabalho. Essa conquista também é de vocês.

A todos os **colegas** de mestrado, pela troca de conhecimento e agradável convívio. Momentos prazerosos ficarão na memória.

Aos **produtores rurais** que se dedicaram em facilitar o desenvolvimento do trabalho e troca de informações.

Enfim, às pessoas que aqui não foram citadas, mas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estimar a prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro. Avaliou-se a presença do patógeno (presença de DNA) em queijos com períodos de maturação entre 4 e 8 dias, em temperatura ambiente, em queijarias cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que possuem assim o aval do órgão para o comércio estadual. Os resultados das análises de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) mostraram que a prevalência da *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijos Minas Artesanal do Serro foi de 30,9% (17/55). Os produtos de DNA amplificados por PCR, de amostras de queijos positivas na PCR foram sequenciados, para diferenciação entre bactérias de origem do campo ou vacinais. O sequenciamento demonstrou 100% de homologia com amostras do campo de *Brucella* spp. Todas as amostras de queijos foram provenientes de rebanhos testados e controlados por meio de exames sorológicos anuais para o monitoramento de *Brucella* spp., segundo determinação da legislação vigente, e apresentaram atestados de controles negativos de veterinários autônomos habilitados.

A presença de DNA de *Brucella* spp. nos queijos sugere uma suposta deficiência no atual programa de controle do patógeno nesses rebanhos e que medidas de identificação e controle mais rigorosas deveriam ser adotadas como medida de segurança alimentar tanto em nível de rebanho, como na matéria prima e no produto acabado.

**Palavras-chave:** *Brucella abortus*; Brucelose humana; zoonose; PCR; PNCEBT



## ABSTRACT

The main objective of the study is to estimate *Brucella* spp. prevalence in dairy herds involved in artisanal cheeses production in Serro's micro-region, Minas Gerais state, named of "Queijo Minas Artesanal" (QMA). The pathogen's evidences (presence of DNA) in cheeses indexed by the "Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA" with ripening periods at normal temperature between 4 and 8 days was evaluated. The results of the polymerase chain reaction (PCR) showed that the DNA of *Brucella* spp. prevalences in Serro's QMA was of 30.9% (17/55). The products of amplified DNA were sequenced for differentiating the bacteria's source: if it came from the environment or from the vaccine. The DNA sequencing demonstrated 100% of homology with environment samples of *Brucella* ssp. All sample of cheeses were from cattletested and controlled through annual serological tests for the monitoring of brucellosis and presented negative control's certificates delivered by autonomous veterinaries.

The presence of DNA *Brucella* spp. in analyzed cheeses suggests a supposed deficiency of brazilian brucellosis control's program in monitoring this specific herds and that stronger measures of control should be adopted in the herds, ingredients and also in the final product as a food safety measure.

**Key words:** *Brucella abortus* ; *Human brucellosis*; *zoonosis*; *PCR*; PNCEBT

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Prevalência de focos e de animais positivos para brucelose nos circuitos pecuários de Minas Gerais .....32

**Tabela 2.** Incidência de Brucelose por país (casos por 100.000 pessoas/ano).....43

**Tabela 3.** Resultado das análises de PCR para detecção da *Brucella* spp. ....49

**Tabela 4.** Intervalo de confiança da proporção ( $p$ ) a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).....49

## Lista de figuras

- Figura 1.** Mapa da Microrregião do Serro produtora de Queijo Minas Artesanal.....19
- Figura 2.** Prevalência da brucelose no rebanho bovino do Brasil.....29
- Figura 3.** Lesões em ossos (A) e tecidos moles (B) causadas por *Brucella* spp. em seres humanos.....39
- Figura 4.** Mapa da distribuição das propriedades selecionadas para as coletas, microrregião do Serro, Minas Gerais, 2014.....46
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR específica para *Brucella* spp. ....50
- Figura 6.** Alinhamento das amostras sequenciadas com amostras do *GenBank*.....51

## Lista de siglas e abreviações

2-ME	2-Mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
CMT	Contagem Microbiana Total
DBIO	Divisão Técnica de Biossegurança
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FC	Fixação de Complemento
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IC	Intervalo de Confiança
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LBM/PL	Laboratório de Biologia Molecular/Pedro Leopoldo
LPS	Lipopolissacarídeo
LQL	Laboratório de Qualidade do Leite
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
QMA	Queijo Minas Artesanal
RB	Rosa de Bengala
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RTPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
SAL	Soro Aglutinação Lenta
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
TAL	Teste do Anel em Leite
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

## Sumario

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Histórico do queijo no mundo e no Brasil .....	16
2.1.1. O queijo no mundo.....	16
2.1.2. O queijo artesanal no Brasil.....	18
2.1.3. O queijo artesanal em Minas Gerais .....	18
2.2. A Legislação Brasileira .....	20
2.3 Brucelose .....	26
2.4. Epidemiologia da brucelose no Brasil e em Minas Gerais .....	29
2.4.1. Situação nacional.....	29
2.4.2. Situação em Minas Gerais.....	31
2.5. Controle e prevenção da brucelose bovina.....	32
2.6. Brucelose e segurança dos alimentos .....	36
2.7. Métodos moleculares de diagnóstico da brucelose nos alimentos.....	43
3. OBJETIVO.....	45
3.1. Objetivo geral.....	45
3.2. Objetivos Específicos.....	45
4. MATERIAL E METODOS .....	45
4.1. Delineamento e local do estudo .....	45
4.2. Planejamento amostral .....	46
4.3. Obtenção de informação sobre as propriedades e os produtores .....	46
4.4. Coleta de amostras de queijo.....	47
4.5 Análises laboratoriais .....	47
4.6. Análises Estatísticas e epidemiológicas.....	48

5. RESULTADOS.....	48
6. Discussão.....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	55
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) provavelmente é o queijo mais tradicional e antigo do Brasil. Com sua origem na colonização portuguesa, quando os colonizadores trouxeram para o Brasil o gado bovino e a receita do queijo da Serra da Estrela, a sua produção hoje constitui um patrimônio a ser preservado, representando o principal produto de sustento de várias famílias produtoras dentro do estado de Minas Gerais.

De acordo com dados da EMATER (2004), o estado de Minas Gerais produz cerca de 70 mil toneladas de Queijo Artesanal por ano, sendo cerca de 33 mil toneladas produzidas por microrregiões produtoras de QMA.

A Microrregião do Serro tem um importante papel na formação histórica dos queijos de Minas Gerais, fazendo parte de um seleto grupo de regiões identificadas como tradicionais na produção de Queijos Artesanais fabricados com leite cru. O modo de produzir, tipo de clima e características de relevo são importantes características que contribuem para o sabor peculiar dos queijos produzidos nesta região.

A fabricação do QMA caracteriza-se pela utilização do leite cru, recém-ordenhado e de um fermento biológico denominado “pingo”. Utilizando as mesmas técnicas desde o seu surgimento, a produção dos QMAs necessita passar por adaptações para adequação às normas higiênico-sanitárias determinadas por lei. Devido à utilização do leite cru em sua fabricação, o QMA pode representar risco à saúde dos consumidores, constituindo um produto potencialmente veiculador de microrganismos zoonóticos, principalmente.

*Brucella* spp., por ser um patógeno presente na glândula mamária de animais infectados e ser eliminada através do leite, representa um perigo em produtos produzidos a partir do leite cru. Procedimentos de segurança alimentar devem ser adotados como forma de garantir um produto seguro para a alimentação humana sem transmitir a zoonose chamada brucelose.

Atualmente, o controle de *Brucella* spp. no rebanho, estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), é adotado pelo IMA para monitoramento da presença desses

patógenos nos rebanhos. Os autores desconhecem estudos relacionados à prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijos Minas Artesanal. O objetivo principal desse trabalho foi estimar a prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro, em queijarias cadastradas pelo IMA, com tempos de maturação variando de 4 a 8 dias, em temperatura ambiente aleatórias. Além disso, identificar nas amostras positivas, se a presença do patógeno tem origem do campo ou vacinal e propor melhorias para o controle da presença do patógeno nos produtos oriundos das queijarias artesanais.

Esse trabalho faz parte do Projeto “Desenvolvimento da agricultura familiar por meio da promoção e aprimoramento agroindustrial artesanal rural em territórios de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia”, coordenado pelo Dr. Rodrigo Paranhos. SEG 06.11.01.012.00.00

Plano de ação: Detecção de agentes zoonóticos e contaminantes químicos, riscos potenciais para a sua ocorrência, percepção dos envolvidos e implantação de processo de educação continuada no sistema produtivo do queijo artesanal do Serro (MG), coordenado pelo Dr. Marcio Roberto Silva. SEG 06.11.01.012.00.06

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Histórico do queijo no mundo e no Brasil**

#### **2.1.1. O queijo no mundo**

O queijo é um dos alimentos mais antigos do mundo. Alguns autores citam sua origem na pré-história, devido à descoberta, em escavações, de utensílios que sugeriam que povos do período Paleolítico já produziam esse alimento. Porém, autores discordam sobre o início da sua produção, tendo relatos de tempos que variam entre 10.000 anos a.C e 2.800 anos a.C. (PIRES, 2003; PERRY, 2004; PIRES, 2013).

Estudos relacionados à área dão conta de que o queijo poderia ter aparecido pela primeira vez há cerca de 10.000 anos a.C., quando as



populações, por uma mudança comportamental, deixaram de ser coletores e caçadores, se fixaram na terra e começaram a produzi-lo, através da agricultura da exploração da criação de animais (PIRES, 2013).

Porém, um grande marco na atividade leiteira surge séculos mais tarde por meio da domesticação dos bovinos, quando os egípcios, ao longo do Rio Nilo, organizavam-se em aldeias e desenvolveram técnicas para a criação de bovinos (PIRES, 2013).

O queijo chegou a Europa por meio dos gregos, onde seus produtores manipulavam de várias formas a massa do queijo para conseguirem diferentes variedades do produto. Esse produto, energético e nutritivo era ofertado aos deuses e servia como um rico alimento para os soldados em guerra (REIS, 1998; PIREs, 2013). Posteriormente, o queijo ganhou reconhecimento gastronômico em Roma. Técnicas modernas de criação do gado e utilização do leite de vaca foram desenvolvidas fazendo com que a produção atingisse maiores escalas, tornando-se um alimento da realeza e dos nobres (PERRY, 2004; PIREs, 2013). Junto com a expansão do Império Romano pela Europa, o queijo e suas variedades ganhavam território e admiração. Em Roma aconteceram também os primeiros registros de que produtores começaram a utilizar *coagulum*, coalho extraído do quarto estômago de cordeiros ou cabritos, e a descrição da técnica de obtenção do queijo a partir do leite fresco (REIS, 1998; PIREs, 2013).

Após ter sua técnica aprimorada pelos romanos, a produção do queijo expandiu-se pela Europa, passando pela França, com importante marco devido ao início da utilização de culturas rotacionadas, que favoreciam a produção do queijo durante todo o ano e a descoberta de novas variedades de alimentos produzidos a partir do leite como as coalhadas e os iogurtes. Nessa época, o queijo produzido em Roma deixava de ser um alimento apenas para abastecimento interno e ganha novos mercados, principalmente pela produção do Queijo Parma (PIRES, 2013).

Os primeiros registros de industrialização do queijo datam no século XVII, em que a máquina substituiu a mão de obra familiar, trazendo ganho de tempo no beneficiamento do leite e condições de acompanhar o aumento da demanda de queijo pelos consumidores.

Um importante avanço da indústria laticinista ocorreu no século XIX, quando o pesquisador Louis Pasteur descobriu a técnica de pasteurização do leite, com o objetivo de aprimorar a condição higiênica dos queijos e, conseqüentemente, melhorando a durabilidade do produto (PIRES, 2013).

### **2.1.2. O queijo artesanal no Brasil**

No Brasil, a produção do queijo artesanal foi introduzida pelos colonizadores portugueses, quando trouxeram para o país o gado bovino e a receita do Queijo da Serra da Estrela (REIS, 1998; PIRES, 2013). Inicialmente, no território baiano, os currais de gado domesticado expandiram-se em direção ao Sul, ao longo das margens do Rio São Francisco, chegando à região do Serro Frio em Minas Gerais (PIRES, 2003; PIRES, 2013).

Na segunda metade do século XVIII, exploradores de ouro chegaram às regiões mineiras, trazendo consigo variações no modo de produzir e no tipo de coágulo implantado para a sua produção, principalmente por meio da utilização do coágulo preparado a partir de partes do estômago seco e salgado de bezerros (RIBEIRO, 1958). Na região do Serro, o queijo chegou pelos caminhos do ouro, mas, somente depois da diminuição da exploração do minério de ferro e do final do ciclo da cana de açúcar que o queijo artesanal produzido na região ganha importância econômica (SOUZA, 1999).

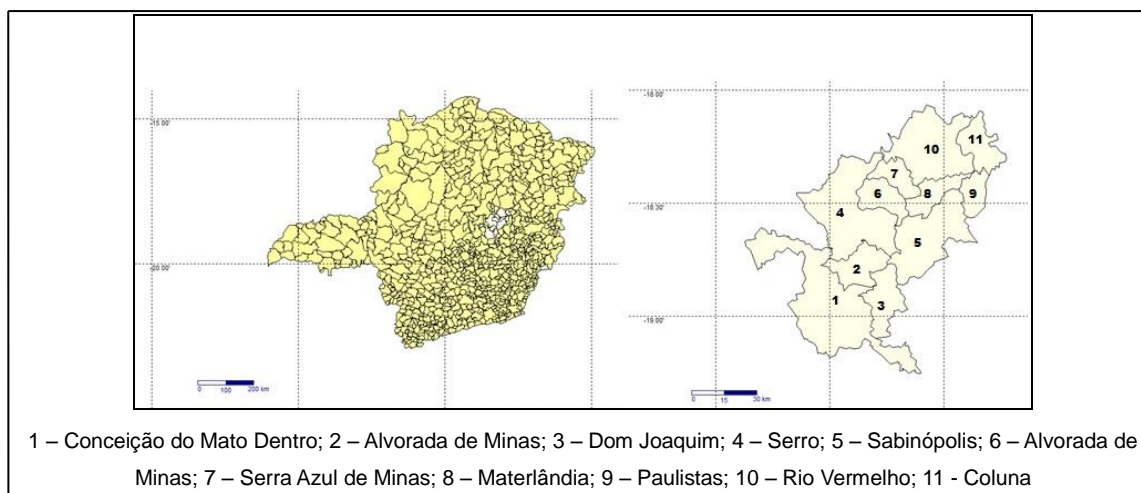
### **2.1.3. O queijo artesanal em Minas Gerais**

A Microrregião do Serro tem um importante papel na formação histórica dos queijos de Minas Gerais. A partir de estudos sobre o processo tradicional de fazer o queijo e de sua importância histórica e cultural, a Empresa de Assistência Técnica de Minas Gerais (EMATER-MG) e o IMA determinaram as sete principais regiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais, sendo elas o Alto Paranaíba, Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (MINAS GERAIS, 2002b; MINAS GERAIS, 2003a; MINAS GERAIS, 2003b; MINAS GERAIS, 2004; MINAS GERAIS, 2009; MINAS GERAIS, 2014a; MINAS GERAIS, 2014b).

A Microrregião do Serro compreende o território dos municípios do Serro, Alvorada de Minas, Coluna, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé e Serra Azul de Minas (Fig. 01) (MINAS GERAIS, 2002b).

O modo de produzir, tipo de clima e características de relevo são importantes características que auxiliaram na determinação dessas regiões. A Microrregião do Serro, uma das pioneiras no setor, e a Microrregião da Canastra são delimitadas oficialmente, contando com registro para fins de indicação geográfica pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (PIRES, 2013).

**Figura 1.** Mapa da Microrregião do Serro produtora de Queijo Minas Artesanal.



Fonte: Trackmaker – André Almeida Santos Duch.

A produção do queijo do Serro começa com a seleção do gado. É muito comum na região a criação de rebanhos mestiços produtores de leite com elevados teores de sólidos, principalmente gordura. Capins nativos, como o meloso, a grama e o Andrequicé conservam as características próprias do leite e da consistência dos queijos. Além disso, o controle sanitário do rebanho, a qualidade da água, a higiene da sala de ordenha e do quarto de produção do queijo, bem como a presença de um bom queijeiro, influenciam diretamente na qualidade do produto final (PIRES, 2013).

## 2.2. A Legislação Brasileira

Segundo o Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA (BRASIL, 1952), Queijo Minas é a denominação genérica que contempla o queijo produzido artesanalmente a partir do leite cru, a variação do concentrado feito com leite pasteurizado.

Em Minas Gerais, quem realiza o cadastro ou a certificação do Queijo Minas Artesanal e a fiscalização do setor produtivo é o Estado, por meio do IMA, que toma como base as Leis Estaduais nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011 (MINAS GERAIS, 2011).

De acordo com a Lei estadual nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011 (MINAS GERAIS, 2011), que dispõe sobre o processo de produção do queijo artesanal em Minas Gerais, é considerado "Queijo Minas Artesanal o queijo elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido. "

As microrregiões onde existe uma tradição histórica e cultural na produção de queijos artesanais estão sendo consideradas as principais produtoras do estado. As microrregiões e os municípios que as compõem serão identificados em portarias específicas sempre que houver solicitação junto ao IMA, por meio de organizações representativas dos produtores, mediante estudos feitos pela EMATER/MG e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que comprovem, através da caracterização da região, sua tradição histórica e cultural na atividade.

Segundo o Decreto estadual nº 44.864 de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a) as queijarias artesanais são estabelecimentos situados em propriedade rural, destinados exclusivamente à produção do Queijo Minas Artesanal, cujo funcionamento é limitado ao consumo do leite da própria fazenda, ressalvados os seguintes casos:

a) assentamentos familiares: a produção do Queijo Minas Artesanal será feita em queijaria núcleo, que receberá o leite dos produtores e ficará responsável pelo controle sanitário de seus rebanhos, bem como pelas demais análises exigidas por este Regulamento; os assentamentos familiares não devem ultrapassar um raio de cinco quilômetros.

b) grupo de produtores: desde que os produtores estejam localizados num raio de até cinco quilômetros e seja composto de, no máximo, quinze participantes.

Adicionalmente, as associações, descritas nos tópicos "a" e "b" serão cadastradas no IMA e observarão a legislação pertinente.

O processo de transformação do leite em queijo, que ocorre nas queijarias, deve obedecer etapas determinadas pela Lei estadual nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011 ( MINAS GERAIS, 2011) que compreende em:

1. Filtração: é o processo de coagem do leite, logo após a ordenha, com o objetivo de retirar sujidades macroscópicas. O primeiro filtro ou coador fica no latão e deve ser constituído de tela de metal, aço inox ou alumínio, nylon ou plástico atóxico. O segundo filtro ou coador fica no tanque de recepção, dentro da queijaria.

2. Adição de fermento natural e coalho: visam à produção da massa para o queijo. Deve se utilizar coalho em pó ou líquido de quimosina de bezerro e soro fermentado, soro - fermento natural salgado ou pingo.

3. Coagulação: é o tempo necessário para atuação do coalho no leite.

4. Corte da coalhada: objetiva a separação do soro. Deve-se cortar a coalhada até obter grãos do tamanho característico do processo de fabricação.

5. Mexedura: também visa à separação do soro. A decantação lenta ou a flutuação dos grãos indica falha no processamento e, portanto, deve-se eliminar a massa com o problema, pois o queijo se tornaria impróprio para consumo.

6. Dessoragem: fase em que o excesso de soro é retirado.

7. Enformagem: nesta fase a massa é colocada nas formas redondas higienizadas para ganhar sua forma característica. Estes utensílios serão especificados em portaria baixada pelo IMA.

8. Prensagem manual: fase que objetiva aproximar bem os grãos para o queijo ficar liso. É feita manualmente usando luvas plásticas descartáveis estéreis ou usando as próprias tampas das formas.

9. Salga seca: fase importante que dá sabor ao queijo. Salgar de ambos os lados usando sal marinho destinado ao consumo humano. Cuidados especiais com sal utilizado que pode carrear contaminantes ao produto acabado. Deve-se colher o pingo num volume mínimo de 4 litros/100 litros de leite.

10. Maturação: fase com duração específica para cada microrregião e objetiva o desenvolvimento do sabor, a desidratação e a estabilização do produto para atingir a consistência desejada.

Além dessas etapas, o processo de produção deve começar em até 90 minutos depois do término da ordenha. (MINAS GERAIS, 2011).

A água utilizada em todas as etapas de produção deverá ser potável, proveniente de nascentes, cisternas, ou poços artesianos, desde que canalizada até o reservatório e protegida contra o acesso de animais. Além disso, a água deverá ser filtrada e clorada a uma concentração de duas a três partes por milhão (ppm). A água utilizada deverá passar por análises periódicas para comprovar a sua potabilidade, essas análises deverão ser realizadas em laboratórios credenciados pelo IMA, visando determinar aspectos físico-químicos como: cor, odor, dureza, cloretos, turbidez, pH, cloro residual, matéria orgânica, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, coliformes totais, coliformes fecais, em padrões determinados pelo IMA (MINAS GERAIS, 2011).

As instalações das queijarias deverão localizar-se distantes de fontes produtoras de mau cheiro, serem construídas de alvenaria e cercadas de modo que não haja entrada de animais dentro da área de produção. Deverá dispor de curral de espera com piso de fácil higienização e sala de ordenha com piso de igual material do curral de espera, ponto de água potável clorada e coberto (MINAS GERAIS, 2011).

Devido ao Queijo Minas Artesanal ser um produto que utiliza o leite cru como matéria-prima, várias ações devem ser adotadas e praticadas para minimizar a contaminação do produto. Em produtos que o leite passa por processos tradicionais de tratamento térmico, “Ultra High Temperature” (UHT)

e pasteurização, os microrganismos patogênicos são eliminados e os deterioradores minimizados ou eliminados a fim de se manter a qualidade microbiológica para o consumo do produto. Como no Queijo Minas Artesanal, o leite utilizado como matéria prima obrigatoriamente deverá ser cru, medidas de controle de contaminação e sanidade do rebanho deverão ser adotadas para garantir a segurança alimentar.

O leite cru utilizado como matéria prima para a produção do Queijo Minas Artesanal deverá respeitar critérios microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pelo Decreto estadual 42.645 de 05 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a).

#### 1. Microbiológicas:

- a) Flora microbiana total  $\leq 100.000$  ufc/mL;
- b) Células somáticas  $\leq 400.000$  unidades/mL;
- c) *Staphylococcus aureus*  $\leq 100$  unidades/mL;
- d) *Escherichia coli*  $\leq 100$  UFC/mL;
- e) Salmonella ausência/ 25 mL;
- f) *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos (Lancefield A, B, C, G e L) ausência/0,1 mL.

#### 2. Físico-Químicas:

- a) Caracteres organolépticos normais;
- b) Teor de gordura: mínimo de 3%;
- c) Acidez em graus Dornic: de 15 a 20°D;
- d) Densidade a 15°C: de 1.028 a 1.033;
- e) Lactose: mínimo de 4,3%;
- f) Extrato seco desengordurado: mínimo 8,5%;
- g) Extrato seco total: mínimo 11,5%;
- h) Índice crioscópico: de -0,550° H a -0,530°H (-0,530°C a -0,512°C);
- i) Livre de resíduos de antibióticos, agrotóxicos e quimioterápicos.

Além dos padrões de análises laboratoriais estabelecidos por lei, o leite deverá passar semanalmente por análises de controle e monitoramento da qualidade por meio da Contagem Total de Microrganismos (CMT) e apresentar valores máximos de 10 mm que corresponde na tabela à contagem de células somáticas inferiores a 400.000 células/mL. Teste de alizarol, onde o leite será considerado próprio para a utilização quando apresentar como resultado uma coloração róseo-salmão sem grumos. O leite deverá ser proveniente de vacas sadias e que não estejam em período de colostragem ou final de lactação (MINAS GERAIS, 2002a).

Ainda, de acordo com o Decreto estadual nº 42.645, de 01 de Agosto de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), no controle sanitário do rebanho, como medidas preventivas de contaminação do queijo, todos os produtores deverão realizar o controle de pragas nas proximidades do local de fabricação e realizar medidas no rebanho tais como:

- I - vacinação contra febre aftosa;
- II - vacinação contra brucelose;
- III - teste de diagnóstico para brucelose;
- IV - teste de diagnóstico para tuberculose;
- V - controle dos animais contra mastite;

VI - controle de parasitas e outras manifestações patológicas, que comprometam a saúde do rebanho ou a qualidade do leite.

Quando o animal estiver em tratamento de mastite, todo o leite proveniente do quarto afetado ou do animal em tratamento com antibioticoterapia sistêmica deverá ser eliminado, sendo proibida a sua utilização como matéria prima. Fêmeas com idade superior a 24 meses, secas ou em período de lactação, deverão ser testadas a fim de se obter resultado negativo de brucelose e tuberculose anualmente, sendo que, se aparecer algum caso confirmado positivo para essas doenças, os animais positivos deverão ser marcados com ferro incandescente com um "P", contido num círculo de 8 cm de diâmetro, ser isolados do rebanho e sacrificados e destruídos em um prazo máximo de 30 dias após o diagnóstico, em estabelecimento sob inspeção do IMA (MINAS GERAIS, 2002a).



As queijarias integrantes do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA), assim que adentrarem ao Sistema, deverão ser controladas contra brucelose e tuberculose, e apresentarem três exames negativos consecutivos com intervalos estabelecidos por lei. Após o terceiro ano de controle, as queijarias a serem relacionadas ou registradas deverão possuir a certificação como livres de Brucelose e Tuberculose de acordo com o Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (MINAS GERAIS, 2013).

Após todo o controle de qualidade da matéria prima e sanitário do rebanho, o queijo produzido deverá passar por análises periódicas de qualidade em laboratório credenciado ou próprio do IMA, sendo essa amostra coletada, acondicionada e enviada por fiscais do órgão (MINAS GERAIS, 2002a; BRASIL, 2013).

Essas amostras deverão seguir parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos por lei como:

1. Físico-químicos:

- a) umidade expressa em base seca: até 45,90%;
- b) amido: negativo;
- c) fosfatase: positiva.

2. Microbiológicos:

- a) Coliforme/g a 30°C:  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 1 \times 10^3$ ,  $M = 5 \times 10^3$ ;
- b) Coliforme/g a 45°C:  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 1 \times 10^2$ ,  $M = 5 \times 10^2$ ;
- c) Estafilococos coagulase positiva:  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 1 \times 10^2$ ,  $M = 1 \times 10^3$ ;
- d) *Salmonella* sp./25 g:  $n = 5$ ,  $c=0$ ,  $m = 0$ ;

e) *Listeria sp*/25 g: n=5, c=0, m=0<sup>1</sup>.

(MINAS GERAIS, 2002a; MINAS GERAIS, 2008).

A fim de garantir a qualidade e inocuidade do Queijo Minas Artesanal, o MAPA estabeleceu que o período mínimo de maturação poderá ser determinado pelo Serviço de Defesa Agropecuário Estadual, indicado por meio de pesquisas científicas. Com essa permissão, o IMA estabeleceu o tempo mínimo de maturação nas microrregiões do Estado, permitindo a maturação de no mínimo de 22 (vinte e dois) dias para as regiões de Canastra, Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes, e 17 (dezesete) dias para a região do Serro (MINAS GERAIS, 2013).

Quando o produto não se apresentar dentro dos padrões estabelecidos por lei ou for constatado o não cumprimento de quaisquer medidas necessárias para garantir a qualidade sanitária, medidas deverão ser tomadas pelo IMA. Essas medidas podem ser um advertência por escrito quando o dano possa ser reparado, passando por apreensão e destruição de produtos impróprios para o consumo e em casos mais graves, o cancelamento do produtor cadastrado (MINAS GERAIS, 2002a).

### 2.3 Brucelose

As bactérias que compõem o gênero *Brucella* spp. são coco-bacilos Gram-negativos, intracelulares facultativos, possuem a capacidade de se multiplicarem em macrófagos, variando entre 0,4 e 3,0 µm de comprimento (HENDERSON, 1971). Apresentam-se em formas isoladas, pares ou em pequenas cadeias; não formam esporos nem cápsulas verdadeiras, são imóveis e aflageladas; aeróbias estritas e catalase positivas (ZAFFARI, 2005; OTA, 2013).

---

<sup>1</sup> n = número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c = número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M; m = limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; M = o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

*Brucella* spp. possui grande capacidade de sobrevivência, principalmente em ambientes úmidos, em matéria orgânica, sem incidência de luz solar direta e pH neutro, podendo sobreviver até 7 meses nessas condições (ALCOLÉA, 2011; ALVES et al., 2011). Em condições naturais, sobrevive por até 200 dias nos exsudatos uterinos, 8 meses em fetos abortados e por 4 dias na urina de bovinos infectados (PAULIN, 2006).

A brucelose é caracterizada como uma zoonose crônica de distribuição mundial (POESTER et al., 2002), que acomete várias espécies de animais domésticos e silvestres e em bovinos é normalmente causada pela espécie *Brucella abortus* (ZAFFARI 2005; ALCOLÉA, 2011; OTA, 2013). As brucelas não são hospedeiro-específicas e sob determinadas condições podem ser transmitidas para outras espécies (ALVES et al., 2011; OTA, 2013).

A transmissão de *B. abortus* pode ocorrer por meio do contato com ou da ingestão de restos fetais, corrimento vaginal ou placenta de animais previamente contaminados. Além dessas formas clássicas de contaminação, a disseminação da brucelose pelo solo e poeira pode ocorrer, principalmente por meio da inalação (MEYER et al., 1990; ALVES et al., 2011). Além disso, vetores mecânicos, como outros animais e o ser humano, podem atuar como meios facilitadores de difusão da infecção (ALVES et al., 2011).

A transmissão da brucelose de um touro infectado para uma vaca sadia pela monta natural possui baixíssima probabilidade, devido à imunidade inespecífica. Por esse motivo, pode-se afirmar que a forma principal de introdução da doença em uma propriedade livre é por meio da compra de vacas infectadas. A principal porta de entrada da *B. abortus* nos animais susceptíveis é a mucosa do aparelho digestivo (ALVES et al., 2011).

Após o contato ou a ingestão, a bactéria chega à corrente sanguínea e aos linfonodos locais. A bacteremia permite a colonização de vários órgãos, tendo maior afinidade por órgãos reprodutores masculinos e femininos. Além da colonização de órgãos reprodutores, *Brucella* spp. possui afinidade pelo tecido mamário, o que explica sua eliminação pelo leite (ALCOLÉA, 2011; OTA, 2013).

Estudos demonstram uma elevada concentração do açúcar eritrol ou eritritol nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas. *Brucella* spp. tem

afinidade por este açúcar, fato que explica a predileção de *Brucella* spp. por esses tecidos. Além de possuir tropismo por esse açúcar, essas bactérias utilizam produtos da degradação do estradiol e das prostaglandinas para o seu metabolismo. A colonização e a multiplicação bacteriana nos trofoblastos permite que as bactérias acessem diretamente o feto (SMITH et al., 1962).

A multiplicação de *Brucella* spp. no ambiente uterino desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas que evolui para necrose e deposição de fibrina entre as vilosidades, podendo causar abortos, aderência e retenção placentária (PAULIN, 2006). Após duas semanas do aborto, como o útero não gravídico é menos susceptível a *B. abortus*, outros órgãos em atividade são colonizados, dentre eles, a glândula mamária e linfonodos supramamários, onde o patógeno permanecerá pelo resto da vida da fêmea, formando granulomas microscópicos no parênquima mamário e sendo excretada constante ou intermitentemente pelo leite durante as lactações (OMS, 1986).

Os úberes infectados são clinicamente normais, sendo uma importante fonte de infecção para bezerros e para o ser humano, que ingere o leite cru e seus derivados, como coalhadas e queijos artesanais (ALVES et al., 2011).

A infecção congênita pode ocorrer em bezerros recém-nascidos como resultados de uma infecção uterina e a enfermidade pode persistir por um longo período, podendo apresentar resultados falso negativos até que o animal se emprenhe e passe pelo seu primeiro parto ou aborto (ALVES et al., 2011).

A infecção no ser humano ocorre por meio do contato com animais ou pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, além da possibilidade de inalação de aerossóis em laboratórios ou nas dependências dos próprios abatedouros (OTA, 2013).

O diagnóstico da brucelose em bovinos pode ser realizada por meio de testes sorológicos que permitem a pesquisa de anticorpos em soro e no leite dos animais contaminados. As técnicas mundialmente reconhecidas para o diagnóstico é a aglutinação rápida em placa com antígeno acidificado, sendo a escolha para a prova de triagem, e as provas complementares como o 2-mercaptoetanol e aglutinação lenta de Wright (ALVES et al., 2011).

A prevenção e o controle da doença são realizados por meio da vacinação de todas as fêmeas com idade entre 3 a 8 meses com a vacina

atenuada Brucelina – B19. Fêmeas que não foram vacinadas nesse período, ainda podem ser vacinadas com a vacina viva atenuada produzida com a cepa RB-51, sem que haja interferência no diagnóstico sorológico da brucelose, pelos testes diagnósticos de rotina (BRASIL, 2006).

O tratamento de animais positivos para brucelose é proibido pelo Ministério da Agricultura, sendo obrigatória a identificação, comunicação aos órgãos oficiais de defesa sanitária e o sacrifício dos animais na propriedade ou em estabelecimentos autorizados (BRASIL, 2006).

## 2.4. Epidemiologia da brucelose no Brasil e em Minas Gerais

### 2.4.1. Situação nacional

A brucelose bovina é uma doença endêmica no Brasil, tendo sido diagnosticada em todos os Estados da Federação (ZAFFARI, 2005). De acordo com o último diagnóstico nacional da brucelose bovina que foi realizado em 1975, estimou-se em 4,0% a porcentagem de animais soropositivos na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte (BRASIL, 2006). Posteriormente, outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns Estados, revelaram alterações na prevalência de brucelose (Fig. 2) (BRASIL, 2006).

**Figura 2.** Prevalência da brucelose no rebanho bovino do Brasil.



Fonte: Poester (2009)

O PNCEBT no Brasil foi instituído no ano de 2001 pelo MAPA com o objetivo de diminuir os impactos negativos para a saúde pública e promover a competição da pecuária interna e externa dos rebanhos bovinos brasileiros. O PNCEBT introduziu a vacinação obrigatória contra a brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas (BRASIL, 2006).

O programa possui como metas específicas a redução tanto da prevalência como da incidência de novos focos de brucelose e de tuberculose e criar um número significativo de propriedades certificadas como livres de ou monitoradas para ambas as doenças, e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

Com o intuito de baixar a prevalência de brucelose, o PNCEBT estabeleceu um prazo máximo até a data de dezembro de 2013 para os Estados implantarem em todo os seus territórios a obrigatoriedade da vacinação de bezerras com idade entre 3 e 8 meses (BRASIL, 2006).

Apesar de todo o controle da brucelose advindo com o programa, Soares Filho et al. (2012), ao pesquisar *Brucella* spp. relataram um fato inusitado no Brasil. Em um rebanho bovino de 1.000 cabeças, livre da doença há 18 anos, certificado pelo MAPA desde 2006, dois animais reagiram aos testes sorológicos de diagnóstico por ocasião dos procedimentos de recertificação em 2008. Após o sacrifício, *Brucella abortus*, biovariedade 1, amostra não vacinal, foi isolada e identificada por meio de provas bioquímicas e de biologia molecular (PCR AMOS). A origem do agente no rebanho é de difícil determinação. No entanto, a adoção de procedimentos preconizados pelo PNCEBT permitiu evitar a disseminação da enfermidade.

Apesar desse fato ter sido o primeiro relato no Brasil, situações de propriedades certificadas livres de brucelose serem reinfectadas após anos de certificação já foram relatados em outros países (SOARES FILHO et al., 2012).

No caso relatado no Brasil, embora seja difícil a determinação da origem da contaminação do rebanho, uma vez que o rebanho era fechado desde 1980, existem hipóteses de que a entrada da infecção ocorreu pelo contato com animais silvestres, uma vez que foram vistas capivaras (*Hidrochaeris*

*hydrochaeris*) ao longo do curso de água e em plantações de milho da propriedade (SOARES FILHO et al., 2012).

#### **2.4.2. Situação em Minas Gerais**

O estado de Minas Gerais tem lugar de destaque na bovinocultura nacional. No último censo rural feito pelo IBGE (IBGE, 2006), são 349.085 propriedades com 20.991.678 bovinos, representando 10,8% do total do país.

No setor de produção leiteira, Minas Gerais lidera os números de produção do país com uma representatividade de 27,8% da produção total do Brasil. Diferenças regionais como clima, topografia e tipo de sistema de produção, além do profissionalismo, colocam as Regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba como as regiões de maior produção dentro do Estado. Na sequência abaixo do Triângulo e Alto Paranaíba, encontra-se as regiões Sul e Sudeste, regiões caracterizadas pelo clima mais frio, elevada qualidade de solo e próximo ao importante mercado consumidor de São Paulo (GONÇALVES et al., 2009).

Apesar de ser o primeiro em produção leiteira em produtividade, o estado de Minas Gerais não apresenta números tão empolgantes. Com 1163 litros/vaca/ano, Minas Gerais está atrás de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal (GONÇALVES et al., 2009). A produção leiteira em Minas Gerais é caracterizada pela pequena produção por produtor e a baixa qualidade do produto (GOMES, 2006; GONÇALVES et al., 2009).

Apesar de ser polo na produção leiteira nacional, o leite produzido em Minas Gerais ainda é comercializado, em grande parte, no mercado informal, sem qualquer tipo de fiscalização. Com isso, a presença de zoonoses como a brucelose representa alto risco para a saúde pública.

Em estudo realizado no ano de 1970, pelo MAPA, o rebanho mineiro apresentou a soro prevalência para brucelose de 17,7% e 6,3 % de fêmeas positivas (GONÇALVES et al., 2009).

Em 2002, Gonçalves et al., (2009), realizaram um estudo de caracterização da situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. Foram testados 20.643 animais de 2.204 propriedades, divididas

entre 7 circuitos dentro do Estado. De forma mais detalhada, os resultados de prevalência de focos e de animais positivos para brucelose nos circuitos pecuários de Minas Gerais estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Prevalência de focos e de animais positivos para brucelose nos circuitos pecuários de Minas Gerais.

<b>Circuito</b>	<b>Regiões integrantes</b>	<b>Prevalência de focos</b>	<b>Intervalo de confiança (IC) focos</b>	<b>Prevalência de animais</b>	<b>Intervalo de confiança (IC) animais</b>
<b>1</b>	Noste - Nordeste - Noroeste	4,70%	2,7-7,7%	0,82%	0,06-1,6%
<b>2</b>	Leste	7,20%	4,6-10,6%	1,20%	0,53-1,8%
<b>3</b>	Central	6,80%	4,3-10,0%	1,50%	0,47-2,4%
<b>4</b>	Zona da Mata	6,50%	4,1-9,8%	1,10%	0,39-1,7%
<b>5</b>	Sul - Sudeste	3,80%	2,0-6,5%	0,40%	0,11-0,69%
<b>6</b>	Alto Paranaíba	6,20%	3,8-9,6%	0,66%	0,29-1,0%
<b>7</b>	Triangulo Mineiro	11,00%	7,7-15,0%	1,10%	0,92-2,6%
<b>Total de todas as regiões</b>		<b>6,00%</b>	<b>5,0-7,1%</b>	<b>1,10%</b>	<b>0,78-1,4%</b>

Foram identificados como fatores de risco a compra de reprodutores, principalmente sem a realização de exames e sem o conhecimento das condições sanitárias do rebanho de origem, a ocorrência de abortos e a presença de animais silvestres na propriedade. Estes resultados mostram a necessidade da conscientização dos produtores sobre a importância de exigir teste de diagnóstico e conhecer as condições sanitárias das propriedades de origem dos animais antes de adquirir estes animais.

O IMA realizou um novo estudo de prevalência de *Brucella* spp. que abrange todo o território do estado de Minas Gerais, esse estudo foi feito entre os anos de 2010 – 2012, porém os dados ainda não foram publicados.

## **2.5. Controle e prevenção da brucelose bovina**

Atualmente, todo o processo de controle e prevenção da brucelose nos bovinos é determinado pelo PNCEBT (BRASIL, 2006). Todo o controle de brucelose bovina, baseia-se em ações de vacinação em massa de fêmeas com idade entre 3 e 8 meses. Além de outras complementares e de controle de



trânsito dos bovinos são importantes para a erradicação da doença (BRASIL, 2006).

O programa do MAPA possui como meta a vacinação de 80% das fêmeas em idade reprodutiva. Dessa forma, haveria redução drástica na frequência de animais não vacinados será muito baixa, diminuindo a quantidade de brucelas vivas circulantes, tornando a vacinação a principal medida de controle e prevenção da brucelose.

Para a vacinação dos rebanhos, atualmente, existem disponíveis no mercado dois tipos de vacinas. A vacina B19, produzida com amostra lisa da bactéria *Brucella* spp. atenuada, para fêmeas jovens. Essa vacina induz a formação de anticorpos específicos contra o LPS liso e pode interferir no diagnóstico sorológico da brucelose, sendo que a persistência desses anticorpos está relacionada com a idade de vacinação. A vacina RB-51 é elaborada com amostra de *B. abortus* rugosa atenuada, originada da amostra lisa virulenta 2308 que sofreu passagens sucessivas em meio contendo concentrações de rifampicina. Por ser uma amostra rugosa, não induz a formação de anticorpos anti-LPS liso e não interfere no diagnóstico sorológico da doença (BRASIL, 2006).

Para a realização da vacinação, médicos veterinários autônomos são capacitados pelo PNCEBT. Esses profissionais são obrigados a informar os órgãos de defesa sanitário estadual por meio da emissão de atestados de vacinação do rebanho. Naqueles municípios onde não existam médicos veterinários interessados em realizar a imunização dos animais, os órgãos de Defesa Sanitária Estadual deverão assumir a responsabilidade da vacinação (BRASIL, 2006).

A eliminação das fontes de infecção, realizada por meio do teste diagnóstico e sacrifício dos animais positivos, é a medida base para a obtenção de propriedades certificadas livres de brucelose. Esse diagnóstico pode ser feito utilizando-se técnicas que identificam diretamente o agente ou por detecção de anticorpos contra a *Brucella* spp. por métodos indiretos (BRASIL, 2006).

Os métodos diretos incluem o isolamento de agentes a partir de material coletado de abortos como feto, conteúdo estomacal de feto e placenta ou de

secreções; identificação dos agentes através da imunohistoquímica realizada em material de aborto fixado com formol; e detecção de ácidos nucleicos através da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) em material de aborto, secreções e excreções (BRASIL, 2006).

Os métodos indiretos ou sorológicos detectam a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. em diversos fluidos corporais e são classificados de acordo com o antígeno utilizado na reação. Esses testes incluem os de aglutinação lenta; aglutinação com antígeno acidificado; aglutinação do anel do leite; aglutinação de Coombs; fixação de complemento; imunofluorescência indireta; imunodifusão em gel; ELISA; hemólise indireta e *Western Blot* (BRASIL, 2006).

Diante da grande quantidade de testes disponíveis para o diagnóstico de *Brucella* spp., o MAPA, definiu os testes oficiais a serem usados no território nacional, sendo eles: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel do Leite (TAL), como testes de triagem e o 2-Mercaptoetanol (2-ME) e a Fixação de Complemento (FC) como confirmatórios (BRASIL, 2006).

O AAT é preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos (BRASIL, 2006).

O TAL é aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Se existirem anticorpos no leite, eles se combinarão com *Brucella* spp., formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva). Não havendo anticorpos presentes, o anel de creme terá a coloração branca e a coluna de leite permanecerá azulada (reação negativa). Tal prova tem limitações, pois poderá apresentar resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mastites ou, ainda, de animais em início de lactação (colostró) (BRASIL, 2006).

O 2-ME é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos que baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e 40 reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME. Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais serem considerados infectados (BRASIL, 2006).

A FC tem sido empregado em países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la. É o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Epizootia (OIE) para o trânsito internacional de animais. Detecta tanto IgG1 como IgM. Em animais vacinados acima de 8 meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente do que os aglutinantes (BRASIL, 2006).

Para a realização dos testes de triagem, o PNCEBT habilita médicos veterinários autônomos que foram aprovados nos cursos de treinamento em métodos de diagnóstico e controle de brucelose e tuberculose, previamente reconhecido pelo MAPA. Esses profissionais, além de realizarem os testes diagnósticos, têm como obrigações fazerem a comunicação dos rebanhos positivos para brucelose aos órgãos de Defesa Sanitária Animal Estadual e de oficializar os casos positivos junto a esses órgãos.

Os órgãos de Defesa Sanitária Animal Estadual, por sua vez, têm como obrigações o controle do trânsito de animais destinados à reprodução, e a aplicação de normas sanitárias para a participação em exposições, feiras, leilões e em outras aglomerações de animais, o controle da venda dos antígenos para os testes de triagem, a realização dos testes confirmatórios,

sacrifício dos animais testados positivos e a Certificação de Propriedades Monitoradas ou Livres para Brucelose (BRASIL, 2006).

Nas propriedades certificadas monitoradas para brucelose, os testes são realizados apenas em fêmeas com mais de 24 meses e em machos reprodutores, com periodicidade anual. Só poderão ingressar na propriedade animais com dois testes negativos ou provenientes de propriedades de condição sanitária igual ou superior (BRASIL, 2006).

Caso não forem detectados animais reagentes positivos, a propriedade receberá o certificado de monitorada para brucelose e tuberculose. Se forem encontrados animais reagentes positivos, os animais não incluídos na amostragem serão submetidos a testes de diagnóstico, e todos os animais reagentes positivos serão sacrificados ou destruídos. Somente após essa etapa a propriedade receberá o certificado de monitorada para brucelose e tuberculose (BRASIL, 2006).

Na certificação de propriedades livres de brucelose, a metodologia consiste na realização de testes de todo o rebanho, num intervalo de 30 a 90 dias entre testes, até que se obtenha resultado negativo em todos os animais testados. Todos os animais reagentes positivos deverão ser sacrificados ou destruídos. Após essa etapa, deverá ser obtido um segundo teste de rebanho negativo com intervalo de 90 a 120 dias (do primeiro) e um terceiro teste de rebanho negativo com intervalo de 180 a 240 dias (do segundo). No último exame, a colheita deverá ser acompanhada pelo serviço oficial de defesa sanitária animal e os testes realizados em laboratório oficial credenciado. Obtidos os três testes de rebanho negativos consecutivos, o estabelecimento de criação estará apto a receber o certificado de livre de brucelose (BRASIL, 2006).

## **2.6. Brucelose e segurança dos alimentos**

No decorrer dos anos, as transformações sociais e agropecuárias, intensificaram os processos produtivos no campo e aproximaram os seres humanos e os animais. Esse contido fez com que aumentasse a disseminação

de doenças entre animais e seres humanos ou de produtos de origem animal para seres humanos (OTA, 2013).

As zoonoses, doenças típicas dos animais que podem ser transmitidas para o homem, correspondem aos maiores índices de ocorrência dentre as doenças de maior relevância para a saúde pública registradas no Brasil. Atualmente, representam cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo. Estudos demonstram que 60% dos patógenos humanos são zoonóticos e que 80% dos patógenos animais têm múltiplos hospedeiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

As doenças transmitidas pelo alimento constituem um grande problema de saúde pública. A contaminação do alimento pode se dar em qualquer etapa da produção, transporte, armazenamento ou comércio, sendo difícil determinar a origem desta contaminação. Algumas zoonoses podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de produtos de origem animal, fonte indispensável de proteína. O controle da qualidade higiênica e sanitária dos alimentos previne a transmissão de doenças.

Todos os produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, adicionados ou não de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito estão sob a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, incluindo, dentre outros, os animais destinados à matança, seus produtos e subprodutos e matérias primas (BRASIL, 1952).

Sendo a glândula mamária um local de multiplicação de *Brucella* spp., o leite e o queijo tornam-se importantes fontes de contaminação. Além do risco de contágio para os manipuladores do alimento, devido às características mercadológicas, o patógeno também pode disseminar facilmente entre consumidores distantes do local de produção (MEYER et al., 1990).

No mundo, são registrados 500 mil novos casos de brucelose humana por ano (COUTO e PEDROSO, 2003), sendo que alguns desses casos possuem a sua origem no consumo de queijo proveniente de leite cru (ZAFARI, 2005).

No México, de 1990 a 1997, a média anual de ocorrência de brucelose humana foi de 5.363 casos novos, sendo que mais de 94% das pessoas tinham

como origem da infecção o consumo de alimentos contaminados, principalmente leite e queijos (PAHO/WHO, 1999).

*Brucella* spp. tem variáveis períodos de sobrevivência nos produtos de origem animal, podendo sobreviver por vários meses em queijos frescos (ZAFFARI, 2005).

Plommet et al. (1988), inocularam experimentalmente cepas de *Brucella* sp. em quarenta e cinco novilhas em diferentes fases de prenhez. Após o parto, foram analisados o leite e os queijos Camembert produzidos a partir desse leite. Após 20 horas de produção do queijo, a concentração de *Brucella* spp. por grama de queijo foi 5 vezes maior do que por mL de leite após a ordenha. No entanto, durante a maturação, devido à acidificação do queijo, a contagem total de bactérias diminuiu consideravelmente, não sendo encontrado mais *Brucella* spp. nos queijos após 18 dias de maturação.

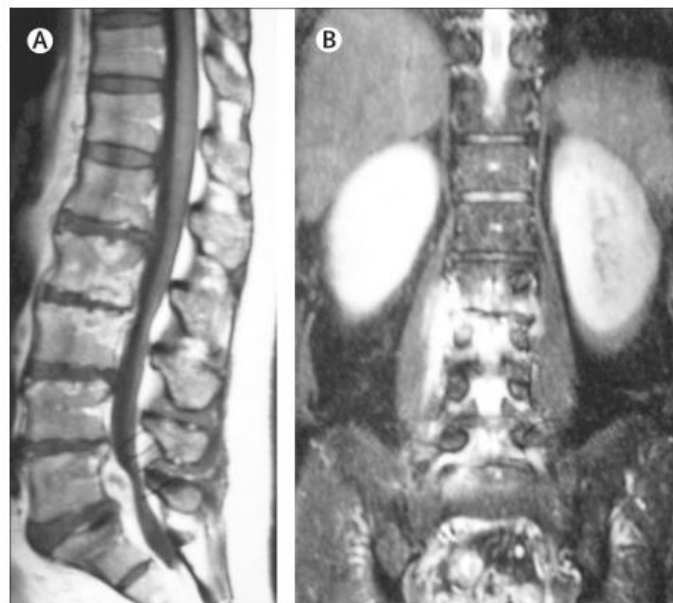
Ota (2013), ao pesquisar *Brucella* spp. em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina, utilizando a técnica de PCR, identificou a presença de seis amostras de leite cru positivas entre as seis amostras coletadas (100%) e dois queijos crus positivos dentre um total de 84 amostras coletadas (2,38%).

Poulsen et al. (2014), ao estudarem a prevalência de brucelose no norte do Equador, testou 2.561 soros de vacas e 301 soros de cabras. Nas vacas, utilizando a técnica do Rosa de Bengala (RB), obteve-se uma prevalência de 7,2% de positividade. A técnica de PCR foi utilizada para testar o leite de cabra e nódulos linfáticos, resultando em 9 e 8% de positividade respectivamente. O teste de RB no soro das cabras demonstrou uma prevalência real de 17,8%.

Em dezembro de 2007, policiais de um posto da polícia militar de Lima, no Peru, deram entrada no hospital com queixas de dores nas articulações, musculares e transpiração excessiva. Em fevereiro de 2008, 13 dos 60 policiais que trabalhavam nesse posto foram diagnosticados com brucelose aguda baseado nos sintomas clínicos e sorologia de triagem positiva Rosa Bengala (RB). Em março de 2008, quatro policiais que tiveram o resultado positivo de brucelose há 1 mês, voltaram ao hospital devido à persistência dos sintomas após o tratamento. Todos os quatro foram diagnosticados sorologicamente positivos e dois eram suspeitos clinicamente de ter a doença ativa com base nos sintomas. Após esses testes positivos de março, todos os policiais do

posto foram convidados a fazerem uma triagem ativa da brucelose (ROMÁN et al., 2012). A Figura 3 mostra lesões em ossos (A) e tecidos moles (B) provocadas por *Brucella* spp. em seres humanos, respectivamente.

**Figura 3.** Lesões em ossos (A) e tecidos moles (B) causadas por *Brucella* spp. em seres humanos.



A - I Adaletli, S Albayram, B Gurses, *et al.* Vasculopathic changes in the cerebral arterial system with neurobrucellosis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27 (2006), p. 384–386

B - MW Al-Sous, S Bohlega, MZ Al-Kawi, J Alwatban, DR McLean. Neurobrucellosis: clinical and neuroimaging correlation. *AJNR Am J Neuroradiol*, 25 (2004), p. 395–401

Cinquenta e dois policiais que trabalhavam no posto foram selecionados para participar de um estudo de rastreamento. Onze policiais, incluindo três que foram diagnosticados positivos em fevereiro de 2008, não participaram do estudo, três novos policiais que não estavam presentes no início do surto entraram no estudo. Os 10 policiais diagnosticados anteriormente mais os 3 que entraram no programa após o surto de fevereiro, mostraram-se positivos para brucelose entre os 52 participantes, ou seja 25% (13/52). Ao avaliar o histórico dos policiais rastreados, 11 dos 13 policiais positivos (84,6%) relataram ter comido queijo fresco de um supermercado da região e 12 dos 13 (92,3%) comeram “papa a la huancaína”, prato típico peruano que leva em sua formulação leite e queijo fresco (ROMÁN et al., 2012).

Ramos et al. (2008), em um estudo epidemiológico de infecção de *Brucella* spp. realizado em Araguaína – TO, coletaram 645 amostras de sangue de pessoas voluntárias que possuíam fatores de risco associados com a *Brucella* spp. Das 645 pessoas testadas, 26 (2%) foram positivos para brucelose. A associação significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada entre pessoas que possuem contato com bovinos ou realizaram a ingestão de leite não pasteurizado, sendo que 0,4% do total de pessoas testadas relataram ter consumido leite cru ou seus derivados não processados termicamente.

Tenorio et al. (2008), realizaram um estudo de presença de anticorpos anti-*Brucella* spp. em grupos ocupacionais envolvidos com a criação de bovinos no Município de Correntes – PE. Foram avaliados os fatores de risco associados à infecção em humanos, utilizando a técnica do AAT. As amostras humanas ainda foram submetidas às técnicas de SAL e 2-ME e, caso esses testes dessem positivos, a FC foi utilizada para a confirmação da positividade. Das 56 pessoas examinadas, 1,8% (1/56) foram positivas na técnica do AAT e 21,4% (12/56) na técnica da SAL, porém nenhuma das amostras foi reagente positiva para o 2-ME. As 13 amostras positivas em AAT (1) e SAL (12) foram submetidas à FC, não apresentando positividade.

Tenorio et al. (2008), ressaltam ainda em seus resultados que, apesar das 12 amostras positivas na SAL, negativas no AAT, 2-ME e FC sugerirem resultados negativos, esses resultados também podem ser entendidos como infecções incipientes de *Brucella* spp. devido à característica do SAL detectar mais imunoglobulina M (IgM) do que IgG.

Em relação aos possíveis fatores de risco da transmissão da brucelose bovina para as pessoas envolvidas neste estudo, 78,6% (44/56) das pessoas disseram que consumiam leite cru e 89,3% (50/56) consumiam derivados de leite cru (TENORIO et al., 2008).

Makita et al. (2010), realizaram um estudo em Kampala, Uganda, com o objetivo de determinar diretrizes para diminuir a incidência de brucelose no território da cidade. Nesse estudo foram coletados soros de 425 vacas pertencentes a 177 rebanhos da região. Além disso, foram colhidos 117 amostras de leite cru e entrevistados 135 vendedores de leite. A entrevista possuía perguntas quanto à fonte do leite, quantidade de leite vendido por dia,



número de dias de trabalho por semana, práticas de tratamento térmico, modos de transporte e destino do leite. As amostras de leite e soro dos animais foram testadas pela ELISA. Em média, 148.924 litros de leite são consumidos pela população de Kampala por dia. A incidência de *Brucella* sp. no leite foi de 12,6%. A incidência anual de brucelose humana foi calculada em 1.009 e a taxa incidência anual de 5,8% por 10.000 pessoas (MAKITA et al., 2010). Quando analisados os questionários, lojas que comercializam leite a granel refrigerado foram apontados como os maiores contribuidores para a incidência de brucelose humana, seguidos pelos vendedores ambulantes (MAKITA et al., 2010). Como solução para o problema, o estudo indica que a construção de centros de pasteurização do leite na cidade e a garantia da venda do leite dos produtores para esses centros, reduziriam o risco de transmissão da doença em até 47,4% e 82,0%, respectivamente (MAKITA et al., 2010).

Em 2012, Román et al., publicaram o primeiro caso de orquite em ser humano causada por *Brucella* spp. no Equador. Na ocasião, em 2009, um trabalhador rural de 44 anos, envolvido no manejo de bovinos, apresentou dor e edema no testículo direito e dor abdominal. Após um primeiro tratamento em novembro de 2009 com diclofenaco sódico, naproxeno de sódio e cefadroxila por 7 dias, o homem retornou ao hospital devido a continuidade das dores. Ao retornar, o médico que o atendia solicitou exames para brucelose, dando resultado positivo para *Brucella* spp. na prova de Aglutinação Lenta. No Centro de Zoonose Internacional da Universidade Central do Equador, foram realizados os testes do Rosa Bengala e Aglutinação Lenta de Wright, os dois testes confirmaram a infecção.

A suspeita de que a doença relatada foi adquirida através do manejo do rebanho com procedimentos veterinários primários como partos e inseminação (ROMÁN et al., 2012) reforça o risco de transmissão zoonótica de *Brucella* spp. a trabalhadores envolvidos na atividade de bovinocultura e consumidores de produtos crus provenientes de rebanhos leiteiros contaminados.

Martins (2006), ao estudar a caracterização microbiológica durante a maturação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro, analisou amostras coletadas em dois períodos (chuva e seca) de 8 propriedades distribuídas entre os municípios pertencentes a microrregião do Serro. Algumas amostras foram

submetidas a 64 dias de maturação em temperatura ambiente (23 °C) e outras sob refrigeração (8 °C) pelo mesmo período. As análises foram baseadas na pesquisa de microrganismos exigidos no Decreto nº 42.645, de 01 de Agosto de 2002 (MINAS GERAIS, 2002<sup>a</sup>). *Brucella* spp. não foi pesquisada nesse estudo porque a legislação vigente não exige a pesquisa desse patógeno em queijos. Porém, análises feitas em vários períodos de maturação ao longo de 64 dias mostraram que coliformes totais (30°C), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, chegaram aos limites estabelecidos com 17 dias de maturação, e sob refrigeração após o período de 33 e 63 dias com queijos produzidos no período da seca e das águas respectivamente. *Listeria* sp. não foi encontrada em nenhuma das amostras e *Salmonella* sp. somente em uma amostra produzida durante o período das águas e mantida sob refrigeração. Essa bactéria foi eliminada após 22 dias.

Dores (2007), durante 64 dias, estudou o período mínimo de maturação em temperatura ambiente (27 °C) e sob refrigeração (8 °C) do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra para garantir a segurança alimentar do produto. Durante o estudo, *Staphylococcus aureus* foi o que permaneceu por mais tempo nas amostras, atingindo os índices exigidos por lei com somente 22 dias de maturação em temperatura ambiente e 35 dias sob refrigeração. Novamente *Brucella* spp. não foi pesquisada nesse estudo porque a legislação vigente não exige a pesquisa desse patógeno em queijos.

Em 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) encomendou uma revisão sistemática da literatura científica publicada entre os anos de 1990 e 2010 sobre a frequência de brucelose humana mundial. Como metodologia, 33 bases de dados foram consultadas, relacionando 2.385 artigos sobre o tema. Destes, 29 foram selecionados e classificados de acordo com critérios pré estabelecidos e utilizados para escrever a revisão. A incidência de brucelose humana variou muito entre os países, provavelmente devido a fatores demográficos, profissionais e socioeconômicos (DEAN, 2012). A tabela 2 mostra os resultados encontrados na revisão.

**Tabela 2.** Incidência de brucelose por país (casos por 100.000 pessoas/ano).

Pais	Nível do Estudo	Incidência por 100.000 por ano
<b>Norte da África e Centro Leste</b>		
Egito	Sub-nacional	0,28 - 70,00
Iraque	Sub-nacional	52,29 - 268,81
Iran	Sub-nacional <sup>o</sup>	0,73 - 141,60
Jordânia	Nacional	25,70 - 130,00
Omã	Sub-nacional*	11,01
Palestina	Sub-nacional	8,00
Arábia Saudita	Nacional	137,61
	Sub-nacional	6,00 - 149,54
Turquia	Sub-nacional	11,93 - 49,54
<b>Sub Sahara África</b>		
Chad	Sub-nacional+	34,86
<b>Oeste Europeu</b>		
Alemanha	Nacional	0,03
Grécia	Sub-nacional	4,00 - 32,49
Itália	Nacional	1,40
<b>Ásia central</b>		
Quirguistão	Nacional	88,00
<b>Américas Central e Sul</b>		
Argentina	Sub-nacional	12,84
México	Sub-nacional	25,69
<b>America do Norte</b>		
EUA	Sub-nacional	0,02 - 0,09

<sup>o</sup> incluiu 1 só estudo de comunidade nômade

\* só crianças

+ comunidade nômade

Fonte: DEAN et al., (2012).

Os resultados foram descritos em dois níveis de estudo: o subnacional (para trabalhos realizados em regiões que não contemplavam todo o território nacional) e o nacional (onde todo o território nacional foi relatado nos estudos). O resultado do estudo demonstra a importância da brucelose como zoonose mundial, muitas vezes negligenciada pelos órgãos de saúde (DEAN et al., 2012).

## 2.7. Métodos moleculares de diagnóstico da brucelose nos alimentos

O método analítico molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real é uma importante ferramenta e garante um diagnóstico

seguro, rápido e preciso para amostras de alimentos (OTA, 2013). Entretanto, a PCR clássica não fornece informações sobre a viabilidade do agente no alimento, sendo necessário, para esta confirmação, a realização de isolamento do agente ou outras técnicas de PCR que quantificariam apenas DNA de agentes microbiológicos viáveis.

Embora não ofereça informações sobre a viabilidade, as técnicas moleculares de PCR clássicas são reconhecidas pelo PNCEBT como métodos complementares de diagnóstico, uma vez que a detecção de DNA de *Brucella* spp. em tecidos ou alimentos, confirmados por sequenciamento de DNA, independente de o agente estar viável ou não nessas matrizes, sugeriria fortemente a sua presença nos rebanhos. *Brucella* spp. é um patógeno endógeno, a presença de seu DNA no alimento ou tecido, independente da viabilidade do patógeno, denunciaria a sua possível ocorrência como infecção nos animais do rebanho de origem.

Miyashiro et al. (2007), analisaram 192 amostras de queijo informal provenientes do Estado de São Paulo e Minas Gerais. No presente estudo, foi realizada uma comparação entre o processo de cultura bacteriana, a PCR e o desenvolvimento de uma reação PCR hemi-aninhado eficiente para a diferenciação de amostras provenientes da vacina B-19 e de infecções do campo. As 192 amostras foram negativas quando analisadas por cultura bacteriana. Porém, 19,27% das amostras foram positivas quando utilizada a técnica de PCR, sendo que desse total, 20, 56% dos queijos Minas frescal e 15,68% dos queijos Minas tipo curado apresentaram resultados positivos. Do total de positivos pela técnica de PCR, quando realizada a diferenciação entre as estirpes da B-19 e de campo, 18,92% apresentaram-se como sendo provenientes do campo.

Ning et al. (2012), utilizaram a técnica de PCR para avaliar o estado de infecção do animal por meio da presença de DNA de *Brucella* spp. em leite cru de 816 vacas. Do total de animais testados, 55 vacas já tinham sido consideradas positivas no teste do AAT e 45% dessas vacas, tiveram a confirmação do resultado através da utilização da PCR em seus leites. No grupo controle, foram coletadas 689 amostras de 3 propriedades consideradas

livres de brucelose. Todos os resultados dessas fazendas deram negativos pela técnica da PCR, demonstrando assim a especificidade do teste.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Estimar a prevalência da *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro e avaliar os fatores associados à presença do agente no alimento artesanal.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Averiguar a presença de *Brucella* spp. em Queijos Minas Artesanais do Serro.
- Verificar a origem da cepa de *Brucella* spp. presente no Queijo Minas Artesanal do Serro.

### **4. MATERIAL E METODOS**

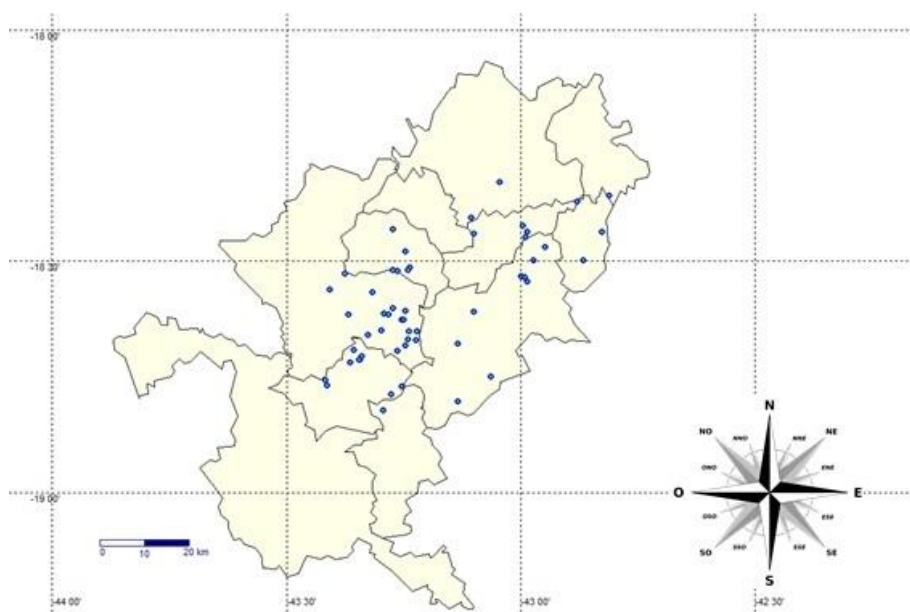
#### **4.1. Delineamento e local do estudo**

Trata-se de um estudo de corte transversal para estimar a prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijos Minas Artesanal da microrregião do Serro. O critério utilizado para a inclusão dos produtores na amostra foi de estar cadastrado no IMA. As propriedades selecionadas foram distribuídas entre os 11 municípios pertencentes à Microrregião do Serro, sendo eles: Alvorada de Minas, Coluna, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Itambé do Mato Dentro, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Serra Azul de Minas, Serro (Fig. 4).

## 4.2. Planejamento amostral

A amostra da população-alvo para estimar o percentual de estabelecimentos positivos para *Brucella* spp. foi determinada por sorteio aleatório de 55 (44%) queijarias entre as 125 constantes no sistema do IMA, sendo desse total 52 cadastradas na Gerência de certificação e 03 cadastradas na Gerência de educação sanitária e apoio a agroindústria familiar do IMA. Em cada uma das propriedades sorteadas foi coletado um queijo, com tempo de maturação entre 4 e 8 dias (dados dos questionários), para representá-la (Fig. 4).

**Figura 4.** Mapa da distribuição das propriedades selecionadas para as coletas, microrregião do Serro, Minas Gerais, 2014



Fonte: Trackmaker – André Almeida Santos Duch.

## 4.3. Obtenção de informação sobre as propriedades e os produtores

Os dados deste trabalho provêm da aplicação de uma entrevista usando um questionário estruturado e resultados de análises laboratoriais, que, uma vez sistematizados, formam a base de dados do trabalho.

Foram entrevistados 55 produtores. O questionário utilizado neste estudo possui questões organizadas por grupo de conteúdo, enfocando as

características socioeconômicas das famílias dos produtores, e gerais da propriedade/rebanho, da sanidade do rebanho, da produção, da produtividade, das questões ambientais e das boas praticas de ordenha e produção.

#### **4.4. Coleta de amostras de queijo**

As amostras de queijo foram coletadas por equipe do estudo, os quais foram capacitados para executar a coleta, armazenamento e transporte de amostras. As coletas foram realizadas entre os meses de junho e dezembro de 2014.

As amostras continham aproximadamente 900 g, coletadas em suas embalagens próprias. As amostras foram mantidas sob refrigeração (<4 °C) até o envio para o Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite (LQL), em caixas isotérmicas com gelo reciclável, em quantidade suficiente para garantir a manutenção da temperatura. No LQL, as amostras foram fracionadas em porções menores de 100 g, acondicionada em bolsas estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB), lacradas, identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável em quantidade suficiente para manter a temperatura < 4 °C até a chegada da amostra ao Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo em Minas Gerais (LANAGRO/MG/MAPA), onde foram realizadas as análises de PCR para *Brucella* spp. e sequenciamento dos produtos de DNA amplificados.

#### **4.5 Análises laboratoriais**

Cada amostra única enviada e analisada no Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo em Minas Gerais (LANAGRO/MG/MAPA) pela Divisão Técnica de Biossegurança-DBIO, Laboratório de Biologia Molecular LBM/PL, foi submetida à reação de amplificação do DNA (reação em cadeia da polimerase ou PCR) direcionada ao gene *eriD*, o qual está presente de forma completa em amostra de campo de *Brucella* spp. e deletado parcialmente na amostra vacinal B19.

Primeiramente, ocorreu a extração do DNA da amostra de queijo de acordo com o protocolo estabelecido pelo kit de extração DNeasy Mericon Food Kit (Hilden, Alemanha).

Após a extração do DNA, foram realizadas PCR em tempo real (RTPCR) direcionadas a duas regiões do genoma (IS 128 e IS 711) de acordo com a metodologia estabelecida por MELO et al. (2014) e “Nested PCR” direcionada o gene *eriD*, ambas com o mesmo objetivo de detectar sequências de DNA de *Brucella* spp., de acordo com a metodologia estabelecida pelo Lanagro Pedro Leopoldo (dados ainda não publicados). A Nested PCR foi usada por ter uma maior sensibilidade que a RTPCR.

Como pode existir alguma possibilidade de um resultado falso positivo para *Brucella abortus* na amplificação do *EriD*, realizou-se o sequenciamento do produto amplificado com o intuito de avaliar o grau de homologia com amostras de DNA presentes em bancos de DNA. O sequenciamento foi realizado de acordo com a metodologia de Sanger no equipamento Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies, EUA). Os resultados foram analisados no programa BioEdit para montagem dos *contigs* e submetidos ao programa Blast (Johnson et al., 2008).

#### **4.6. Análises Estatísticas e epidemiológicas**

A prevalência da presença de genes de amostras de campo de *Brucella* spp. detectadas por PCR em queijos artesanais de propriedades da microrregião do Serro foi determinada. No cálculo estatístico, foi utilizado o programa Epiinfo para estimar o intervalo de confiança para uma proporção ( $p$ ) com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **5. RESULTADOS**

Todas as propriedades apresentaram resultados anuais negativos para brucelose, através do teste AAT realizada por Médicos Veterinários autônomos habilitados.



Os resultados das análises de PCR por gene ou técnica são apresentados na Tabela 3.

A análise do intervalo de confiança da proporção ( $p$ ) a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 3.** Resultado das análises de PCR para detecção da *Brucella* spp.

N° amostras		Brucelose		
		PCR em tempo real		NESTED PCR
		IS** 128	IS 711	
Positivo*	17	5	5	15
Negativo	38	50	50	40
<b>Total</b>	<b>55</b>			

\* = n° de amostras positivas em pelo menos 1 dos testes. Algumas amostras foram positivas em mais de um dos testes, totalizando 17 amostras positivas.

\*\* = IS: Sequencia de inserção

**Tabela 4.** Intervalo de confiança da proporção ( $p$ ) a um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ )

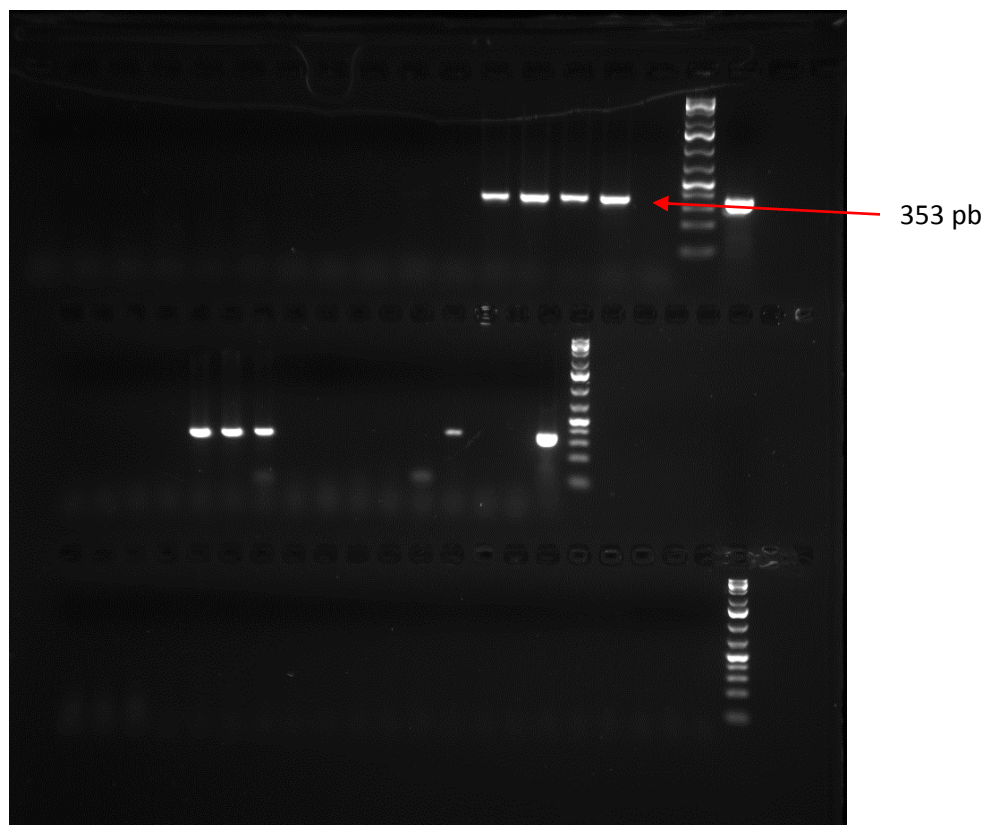
N° de amostras	<i>Brucella</i> sp.		% positivos ( $p$ )
	Positivo	Negativo	
55	17	38	30,9
<b>95% IC(<math>p</math> em %): (18,7; 43,1)</b>			

Após a realização das análises de PCR nas amostras, o estudo chegou ao número de 17 propriedades produtoras de QMA positivas para a presença de *Brucella* spp. na microrregião do Serro MG.

Sequências de 353 pares de base, região do gene *EriD*, do DNA de amostras positivas para *Brucella* spp. pela Nested PCR (Fig. 5) foram submetidas ao sequenciamento do DNA e analisadas no programa Blast. Verificou-se 100% de similaridade com as sequências de DNA de estirpes de *Brucella* spp. de campo, disponíveis no GenBank (Fig. 6). Neste caso, o valor

de “e”<sup>2</sup> foi de 3e-179 e o percentual de cobertura de 100%. Houve também alto grau de identidade do produto amplificado com o DNA de amostra vacinal *Brucella* spp. B19. O valor de “e” foi mais alto (7e-117), mas apresentou um percentual de cobertura mais baixo (67%, alinhamento de 238 dos 353 pares de base analisados). Essa menor taxa de alinhamento da sequência de DNA aconteceu devido à deleção do gene *eriD* que está presente na amostra vacinal B19. Essa maior taxa de homologia com estirpes de campo evidencia que as sequências amplificadas não se tratam de cepas vacinais.

**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR específica para *Brucella* spp.

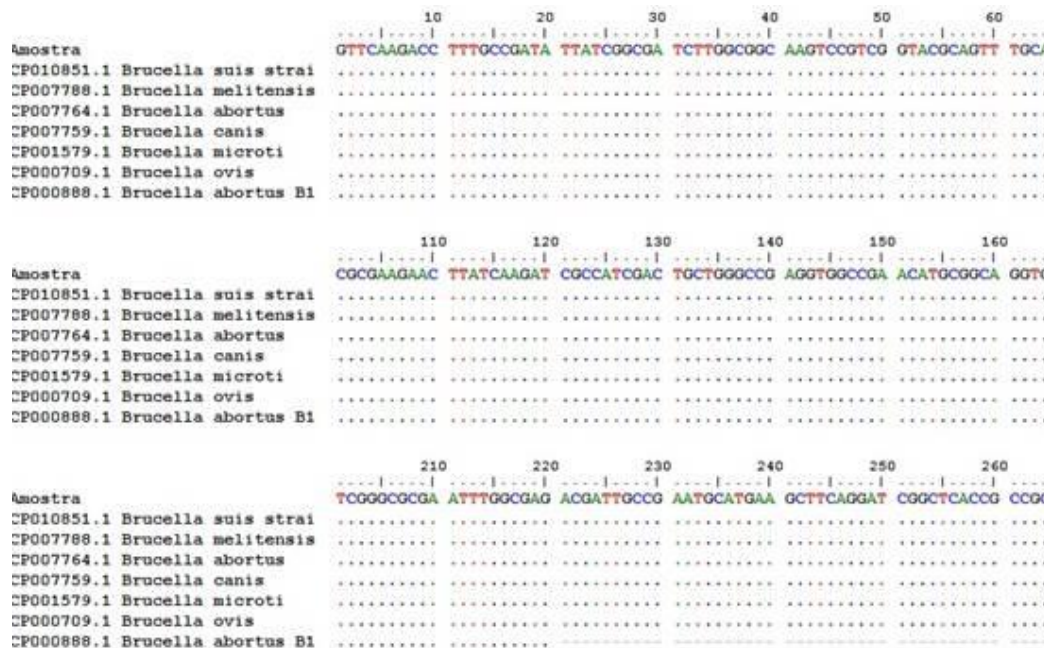


Fonte: Antônio Augusto Fonseca Junior (LANAGRO/MG – MAPA)

---

<sup>2</sup> e = potencia de 10.

**Figura 6.** Alinhamento das amostras sequenciadas com amostras do GenBank.



Fonte: Blast - Antônio Augusto Fonseca Junior

## 6. Discussão

A técnica de PCR utilizada detectou a presença de DNA do microrganismo e o sequenciamento do produto de DNA amplificado evidenciou tratar-se de estirpes de campo de *Brucella* spp. Tanto o teste de PCR como o sequenciamento de DNA utilizados não comprovam a viabilidade da estirpe de *Brucella* spp. no produto analisado, uma vez que as amostras possuíam de 4-8 dias de maturação. Porém, independente da viabilidade ou não, os testes atestam a presença deste problema sanitário no rebanho, que, de acordo com o Decreto estadual nº 42.645 de 05 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), não é permitido. Segundo o mesmo decreto, animais portadores de brucelose não podem fornecer leite para a produção do QMA.

O período de maturação das amostras utilizadas no estudo foi inferior ao período mínimo estabelecido por lei para a microrregião do Serro que seria de 17 dias (dados dos questionários). A comercialização de queijos com menos de 17 dias de maturação é pratica comum entre os produtores da região, que normalmente tem acontecido entre 4 e 8 dias. Estes períodos de maturação não são suficientes para atingir o pH necessário para a inativação de *Brucella*

spp, que seria de 4,0 para uma morte lenta e abaixo de 3,5 para uma morte rápida das bactérias (WHO, 2006). A ocorrência de *Brucella* spp. em queijos frescos foram encontradas por outros estudos como o de Plommet et al. (1988), quando detectou a presença em queijos camembert em períodos inferiores a 18 dias de maturação, Miyashiro et al. (2007), quando detectou a presença em queijos ilegais, tipo frescal e tipo curado e Ota (2013), quando detectou a presença em queijo colonial.

Atualmente, há dúvidas se o período de 17 dias de maturação é válido para garantir a inocuidade do Queijo Minas Artesanal do Serro em relação a qualquer patógeno, sendo necessários mais estudos. Estudos de sobrevivência da *Brucella* spp. ao longo do tempo de maturação seriam importantes, uma vez que, ao longo da maturação, temos o desenvolvimento de bactérias lácticas e conseqüentemente aumento da produção de ácido láctico que potencialmente poderia inibir o desenvolvimento de *Brucella* spp. nesses produtos. Plommet et al. (1988), observou a inexistência de *Brucella* spp. viável em queijos a partir de 18 dias de maturação. Dores (2006) e Martins (2007) observaram a diminuição da contagem bacteriana de patógenos descritos na legislação ao longo do período de maturação, encontrando períodos que garantiram a segurança alimentar de 17 e 22 dias para os Queijos Minas Artesanal do Serro e da Canastra respectivamente. Entretanto, esses pesquisadores não analisaram para a presença de *Brucella* spp.

A legislação estadual para a fabricação do Queijo Minas Artesanal não faz menção à análise da presença de *Brucella* spp. diretamente nos queijos, o que seria algo para reflexão dada a importância deste agravo à saúde pública. Em Minas Gerais, o único controle disponível, direcionado à infecção por *Brucella* spp. no rebanho é o exigido para produtos destinados ao mercado interno do estado de Minas Gerais (controle anual do rebanho para brucelose por meio de exames dos animais e vacinação de bezerras de 3 a 8 meses) e, para as queijarias autorizadas a comercializar os seus produtos fora das fronteiras do Estado, cobra-se a certificação de livres de Brucelose e Tuberculose. Esta certificação é importante, porém, propriedades controladas ou certificadas livres de brucelose não estão isentas indefinidamente da infecção por *Brucella* spp., como foi demonstrado no trabalho de Soares Filho et

al. (2012), o que demanda controles adicionais no alimento artesanal, como a maturação, para assegurar a inocuidade do produto ao consumidor.

A detecção do DNA de *Brucella* spp. diretamente no queijo artesanal poderia constituir-se em uma importante ferramenta diagnóstica complementar tanto para a detecção deste perigo potencial no alimento como para completar o monitoramento do “status” livre dos rebanhos. Como o exame de DNA é muito sensível, poderia detectar rebanhos positivos, mesmo possuindo uma baixa prevalência de animais positivos eliminando o patógeno. A aplicação da PCR como diagnóstico para a presença de *Brucella* spp. nos alimentos derivados de leite foi avaliada por outros estudos como o de Miyashiro et al. (2007), Ning et al. (2012), Ota (2013) e Poulsen et al. (2014), mostrando-se como uma alternativa de teste rápido aos testes sorológicos tradicionais para monitoramento de *Brucella* spp. em rebanhos.

Para um maior controle das propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal, o IMA deveria identificá-las como propriedades de risco, seguindo protocolo semelhante ao descrito no Manual de Vigilância Veterinária de Doenças Vesiculares, adotado pelo MAPA (BRASIL, 2007). Resumidamente, o manual descreve as seguintes atividades de acompanhamento: obtenção e registro de informações epidemiológicas relevantes; consolidação e análise dos dados recolhidos; decisão e estabelecimento dos procedimentos preventivos; execução das operações de emergência e notificação e divulgação de comunicados com informações sobre a doença e sobre os resultados das medidas aplicadas em todos os meios disponíveis para atingir grande parte dos envolvidos pelo sistema de vigilância. Adicionalmente, durante os períodos de vacinação do rebanho contra a febre aftosa, os fiscais estaduais poderiam atualizar “in loco” os cadastros dos animais das propriedades e acompanhar a vacinação das fêmeas com idade entre 3 e 8 meses contra brucelose. Isto daria uma maior segurança de que a vacinação das bezerras realmente é feita.

Outra medida que poderia aumentar a segurança de que os exames de brucelose estão sendo realizados pelos veterinários autônomos e de que o “status” monitorado ou livre é de fato verdadeiro, seria o monitoramento dessas propriedades com testes rápidos para detecção de anticorpos no leite como o teste do anel em leite (TAL). Essas análises rápidas para detecção de *Brucella*

*abortus* no leite deveriam ser adotadas como análises de rotina nas queijarias e, caso essa prova acusasse algum animal positivo, esta propriedade deveria ser notificada ao IMA, seus produtos proibidos de serem comercializados e a propriedade interdita até a realização do teste confirmatório do 2-ME. Caso confirmada a positividade da propriedade para *Brucella* spp., haveria o sacrifício dos animais positivos, caso contrário, a propriedade seria desinterditada, dando prosseguimento à produção de queijos artesanais.

O resultado de 30,9% (17/55) de amostras positivas do presente estudo é expressivamente superior aos 6,0% encontrados no estudo de caracterização da situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais, realizado por Gonçalves et al. (2009). De forma mais detalhada, levando-se em consideração somente os circuitos que possuem propriedades inseridas nos municípios pertencentes à microrregião do Serro, os resultados de prevalência de focos para brucelose foram: circuito 1, 4,7% e circuito 3, 6,8%. Hipóteses para essa expressiva positividade entre as propriedades do presente estudo podem ser levantadas. Pode-se inferir que talvez essas propriedades estejam adquirindo animais de alta produção de leite, supostamente positivos, sem exigir exames sanitários recomendados como os de brucelose e tuberculose.

O resultado do presente estudo aproxima-se mais dos 19,27% de positividade encontrados por Myiashiro et al. (2007), utilizando testes de PCR para a detecção de *Brucella* spp. em queijos Minas Frescal e curado, informais, nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Porém, diferente do presente estudo, que encontrou alta taxa de homologia das estirpes encontradas com as de campo, no estudo de Myiashiro et al. (2007) 81,08% foram linhagens de *Brucella* spp. vacinais B19 e apenas 18,92% foram de campo.

Finalmente, ressalta-se que o Queijo Minas Artesanal contaminado com *Brucella* spp. pode representar um risco à saúde pública, devido as características zoonóticas dessa bactéria, como foi demonstrado no estudo de Ramos et al. (2008), quando observou a associação significativa ( $p < 0,05$ ) entre pessoas testadas positivas para brucelose e a ingestão de leite cru ou seus derivados.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro foi alta (30,9%), o que pode resultar em risco potencial à saúde pública. A identificação de *brucella* spp. nos queijos, por isolamento ou por amplificação e sequenciamento do DNA, poderá auxiliar os órgãos de defesa agropecuária a criar legislações específicas que garantam um melhor controle sanitário do rebanho, refletindo, conseqüentemente, na segurança do leite e de seus derivados, principalmente os produzidos de forma artesanal.

Com relação à brucelose, o efetivo controle sanitário do rebanho produtor de leite é o principal caminho para a elaboração de um produto artesanal, feito a partir de leite cru, seguro ao consumidor. Assim, a garantia da implantação das Boas Práticas de Fabricação focadas no controle de zoonoses importantes como a brucelose e tuberculose bovinas é essencial para a qualidade sanitária dos queijos artesanais.

Pela importância da brucelose como zoonose e devido a sua grande disseminação no país, é necessário tratar essas propriedades produtoras de queijos artesanais como “propriedades em risco”, pelo IMA e outros órgãos de defesa. Essa classificação demandaria um maior acompanhamento por parte dos fiscais agropecuários no controle sanitário do rebanho produtor e na manutenção do “status” livre de brucelose e tuberculose bovinas, fundamental para a garantia da segurança do alimento artesanal.

Como medidas complementares para evitar riscos de zoonoses provenientes de produtos artesanais, como brucelose e tuberculose bovinas, ao consumidor, sugere-se a intensificação da fiscalização no sentido de coibir a venda dos queijos artesanais sem o devido período de maturação.

Finalmente, acredita-se que mais trabalhos devem ser realizados para subsidiar o MAPA e o IMA para criarem estratégias para reavaliação do atual programa de combate a brucelose e a tuberculose bovina.

## 8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ADALETI, I; ALBAYRAM, S; GURSES, B; et al. Vasculopathic changes in the cerebral arterial system with neurobrucellosis. **AJNR Am J Neuroradiol**, 27, p. 384–386, 2006.

AL-SOUS, MW; BOHLEGA, S; AL-KAWI, MZ; ALWATBAN, J; MCLEAN, DR;. Neurobrucellosis: clinical and neuroimaging correlation. **AJNR Am J Neuroradiol**, 25, p. 395–401, 2004.

ALCOLÉA, Vanessa Cristina. **Detecção de *Brucella* spp. pela reação em cadeia pela polimerase em Queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente na região centro oeste do estado de São Paulo**. Botucatu: UNESP, 2011. 41 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

ALVES, A. J. S.; VILLAR, K. S. Brucelose Bovina e sua situação sanitária no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 2, p. 12–17, 2011.

BRASIL – Ministério da Agricultura. R.I.I.S.P.O.A. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Estatui as normas que regulam, em todo o território nacional, a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, DF, 29 mar. 1952.

BRASIL – Ministério da Agricultura. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 2006.

BRASIL – Ministério da Agricultura. Manual de vigilância veterinária de doenças vesiculares MAPA, de outubro de 2007. Brasília, DF: MAPA, 2007.



BRASIL – Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Brasília, DF: MAPA, 2013.

COUTO, D. F. M.; PEDROSO, E. R. P. Doenças Infecciosas e Parasitárias relacionadas ao trabalho. **Mendes R (ed) Patologia do trabalho**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2ª edição, v. 1 cap. 19, p. 892-893, 2003.

DEAN, A. S.; CRUMP, L.; GRETER, H.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. nº 10, v. 6, 2012.

DORES, M. T. **Queijo Minas Artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. Viçosa: UFV, 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. **Revista da EMATER – MG**. Ano XXII, nº 80, p. 8-9, 2004.

GOMES, S.T. Diagnóstico da pecuária leiteira do Estado de Minas Gerais em 2005: Relatório de pesquisa. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. 156p.

GONÇALVES, José. **A retórica da perda: os discursos do patrimônio cultural do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ; IPHAN, 1996.

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. B.; ALVES, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. São Paulo, v. 61, supl. 1, p. 35-45, 2009.

HENDERSON, J.L. **The Fluid-milk Industry**. Connecticut: The Avi Publishing Company, INC., p.85-88, 1971.

IBGE. **Senso agropecuário 2006**. Rio de Janeiro 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm> Acesso em: 23 jan. 2015.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MEREZHUK, Y.; MCGINNI, S.; MADDEN, T. L.. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**. Jul 1;36(Web Serverissue):W5-9, 2008.

MAKITA, K.; FÈVRE, E. M.; WAISWA, C.; EISLER, M. C.; WELBURN, S. C. How Human Brucellosis Incidence in Urban Kampala Can Be Reduced Most Efficiently? A Stochastic Risk Assessment of Informally-Marketed Milk. **PLOS ONE**. n° 12, v. 5, 2010.

MARTINS, J. M. **Características Físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro**. Viçosa: UFV, 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MELO, C. B.; DE SÁ, M. E. P.; SOUZA, A. R.; DE OLIVEIRA, A. M.; MOACYR, P.; MOTA, P. M. P. C.; CAMPANI, P.R. Bacteria in dairy products in baggage of incoming travelers. **Emerging Infectious Diseases**. Brasil, v. 20, n° 11, p. 1933 – 1935, 2014.

MEYER, M. E; BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y.C. **Review of veterinary microbiology**: Blackwell Scientific Publications. Illinois: p. 283-285, 1990.

MINAS GERAIS. Decreto n° 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Minas Gerais, BR, 05 jun. 2002a.

MINAS GERAIS. Portaria n° 546, de 29 de outubro de 2002. Identifica a microrregião do Serro. Minas Gerais, BR, 29 out. 2002b.

MINAS GERAIS. Portaria n° 594, de 10 de junho de 2003. Identifica a microrregião e Araxá. Minas Gerais, BR, 10 jun. 2003a.

MINAS GERAIS. Portaria n° 619, de 01 de dezembro de 2003. Identifica a microrregião do Alto Paranaíba. Minas Gerais, BR, 01 dez. 2003b.

MINAS GERAIS. Portaria n° 694, de 17 de novembro de 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Minas Gerais, BR, 17 nov. 2004.

MINAS GERAIS. Decreto n° 44.864, de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Minas Gerais, BR, 01 ago. 2008.

MINAS GERAIS. Portaria n° 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes. Minas Gerais, BR, 03 nov. 2009.

MINAS GERAIS. Lei n° 19.492, de 13 de janeiro de 2011. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Minas Gerais, BR, 13 jan. 2011.

MINAS GERAIS. Portaria n° 1.305, de 30 de abril de 2013. Trata de diretrizes para produção de queijo minas artesanal exclusivamente a partir de leite cru de vaca, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo), em regiões específicas do estado de Minas Gerais. MINAS GERAIS, BR, 30 abr. 2013.

MINAS GERAIS. Portaria n° 1.397, de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a microrregião do Triângulo Mineiro. Minas Gerais, BR, 13 fev. 2014a.

MINAS GERAIS. Portaria n° 1.428, de 29 de agosto de 2014. Identifica a microrregião da Serra do Salitre. Minas Gerais, BR, 29 ago. 2014b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. **Boletim eletrônico Epidemiológico**, Ano 10, n. 2, 2010. Disponível em: [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs) Acesso em: 27 janeiro 2015.

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

NING, P.; GUO, K.; XU, L.; ZHANG, C.; CHENG, Y.; CUI, H.; LIU, W.; LV, Q.; CAO, W.; ZHANG, Y. *Short communication: Evaluation of Brucella infection of cows by PCR detection of Brucella DNA in raw milk.* **Journal Dairy Science**. N° 95, p. 4863-4867, 2012.

OMS – ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Comite Mixto FAO/OMS de expertos em brucellosis**. Genebra, 146 p, 1986.

OTA, Eva Terezinha dos Santos. **Deteção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real**. Florianópolis: UFSC, 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PAHO/WHO – Pan American Health Organization/World Health Organization. **Brucellosis PAHO/WHO Experts Consultation Meeting on Vaccines and Vaccination Strategies**, 1999.

PAULIN, L.M.S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas de sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Babalus bubalis*)**. Tese (doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 92p, 2006.

PERRY, Katia S.P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, vol. 27, n° 2, 293-300, 2004.

PIRES, M. C. S.. **Memória e arte do queijo do Serro: o saber sobre a mesa**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2013.

PIRES, Maria C. S. **Produção artesanal do queijo do Serro**. Belo Horizonte 2003. Disponível em: [http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires\\_01.pdf](http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires_01.pdf)  
Acesso em: 23 jan. 2015.

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

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

POESTER, F. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009

POULSEN, K. P.; HUTCHINS, F. T.; MCNULTY, C. M.; TREMBLAY, M.; ZABALA, C.; BARRAGAN, V.; LOPEZ, L.; TRUEBA, G.; BETHEL, J. W. Short Report: Brucellosis in Dairy Cattle and Goats in Northern Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n° 90, v. 4, p. 712 – 715, 2014.

RAMOS, T. R. R.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOURA SOBRINHO, P.A.; SANTANA, V. L. A.; GUERRA, N. R.; MELO, L. E. H.; MOTA, R. A. Epidemiological Aspects of an Infection by *Brucella abortus* in Risk Occupational Groups in the Microregion of Araguaína, Tocantins. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. N° 12, v. 2, p. 133-138, 2008.

REIS, A. R.. **Caracterização físico-química e identificação dos elementos metálicos dos queijos minas do Serro e minas da Serra da canastra**. Belo Horizonte: UFMG, 1998, 96f. Dissertação de Mestrado em Farmácia – Programa de pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

RIBEIRO, J. de A. **A evolução da tecnologia queijeira**. 1958.

ROMÁN, J. R.; SAEGERMAN, C.; MINDA-ALUISA, E.; BENÍTEZ-ORTÍZ, W.; BRANDT, J.; DOUCE, R. Case Report: First Report of Orchitis in Man Caused by *Brucella abortus* Biovar 1 in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n° 87, v. 3, p. 524-528, 2012.

ROMÁN, K.; CASTILLO, R.; GILMAN, R. H.; CALDERÓN, M.; VIVAR, A.; CÉSPEDES, M.; SMITS, H. L.; MELÉNDEZ, P.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; MAVES, R. C.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M.; SAITO, M. A Foodborne Outbreak of Brucellosis at a Police Station Cafeteria, Lima, Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n° 3, v. 88, p. 552-558, 2013.

SMITH, H.; WILLIAMS, A.E.; PEARCE, J.H.; KEPPIE, J. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. **Nature**, v. 193, p. 47-49, 1962.

SOARES FILHO, P. M.; WANDERLEY, R.P.B; FARIA, G. C.; PENNA, A. G.; RIBEIRO, D. B. C. L.; ASSIS, R. A.; LEITE, R. C.; FONSECA JUNIOR, A. A.; RIBEIRO, A. C. C. L. Confirmação de infecção por *Brucella abortus* em um rebanho bovino certificado livre em Minas Gerais: relato de caso. **Arquivo**

**Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** N° 5, v° 64, p. 1133-1136, 2012.

SOUZA, M. E. **Aconteceu no Serro.** Belo Horizonte: BDMG Cultural, 1999.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Corbel M. J. (Org.). **Brucellosis in humans and animals.** Geneva: World Health Organization, 102p, 2006.

ZAFARI, Cristina Bergman. **Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. em queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRGS, 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.