MARIANA GESUALDO DE OLIVEIRA

**Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de
queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética
de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos: Revisão
Sistemática e meta-análise**

São Paulo

2018

Mariana Gesualdo de Oliveira

Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos: Revisão Sistemática e meta-análise

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dra. Evelise Oliveira Telles

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3638
FMVZ

Oliveira, Mariana Gesualdo de
Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos: revisão sistemática e meta-análise / Mariana Gesualdo de Oliveira. – 2018.
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

Co-orientadora: Profa. Dra. Camila Marinelli Martins.

1. Brucelose. 2. Alimentos. 3. Queijo. 4. Sobrevivência. 5. Revisão sistemática. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da cura de queijos na inativação de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus*", protocolado sob o nº 2425/2011, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Effect of cheese ripening on the inactivation of *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus*", protocol number 2425/2011, not using animals, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Mariana Gesualdo

Título: Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos – Revisão Sistemática e Meta-análise.

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em epidemiologia experimental aplicada às zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente minha mãe Wanda por todo incentivo e apoio incondicional, e meus tios Edson e Vilma, por todos os conselhos, desde à graduação até a conclusão do mestrado.

A professora Evelise, pela excelente orientação, compreensão e ajuda em todos os momentos que precisei, e por todos os ensinamentos.

A professora Camlia Marinelli, por toda a ajuda na co-orientação do projeto, por todos os ensinamentos e ideias que foram essenciais para a pesquisa, e que contribuíram de forma significativa para meu aprendizado.

A Sandra Sanchez pela amizade, pelas conversas e todo carinho, desde a época de estágio no laboratório de higiene de alimentos.

Aos meus queridos amigos, em especial Marcela Morelli, Bruna Arssuffi, Mariana Veloni e Priscila Abreu, por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, nestes 10 anos de amizade.

Ao Cnpq, pelo apoio financeiro ao projeto.

Resumo

OLIVEIRA, M.G. **Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos**: Revisão Sistemática e Meta-análise [*Brucella abortus* infection in humans by the consumption of cheese made from raw milk and its association with survival kinetics of *Brucella abortus* in cheeses – Systematic Review and Meta-analysis]. 2018. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* que têm no leite cru, e seus derivados, uma importante via de transmissão para o homem. Considerando a situação endêmica da brucelose no Brasil e que o consumo de queijos fabricados com leite cru é um hábito persistente, torna-se relevante a organização das informações disponíveis para a futura e necessária estimativa do risco associado ao consumo deste tipo de produto. Os dados foram levantados com o uso da Revisão Sistemática de Literatura, sobre os diversos fatores que podem modular a sobrevivência da bactéria no queijo. Os resultados obtidos demonstraram que há poucos dados, especialmente quantitativos, sobre o tema. Forneceram dados qualitativos 16 artigos, dentre estes 4 (totalizando 9 experimentos) foram utilizados para análise quantitativa por meta-análise, pelo método de meta-regressão. Os resultados demonstraram existir influência do tempo de cura sobre a diminuição da população bacteriana, também associada a valores reduzidos de pH e atividade de água. Foram detectadas lacunas de conhecimento relacionadas a dose infectante, a interação deste agente com a microbiota natural do leite e do queijo, e a falta de dados experimentais sobre o comportamento de sobrevivência da *Brucella* em queijos. A obtenção destes dados poderá facilitar a construção de modelos de predição da sobrevivência deste agente nestes produtos futuramente.

Palavras-Chave: Brucelose, alimentos, queijo, sobrevivência, revisão sistemática

Abstract

OLIVEIRA, M.G. ***Brucella abortus* infection in humans by the consumption of cheese made from raw milk and its association with survival kinetics of *Brucella abortus* in cheeses**: Systematic Review and Meta-analysis [Infecção humana por *Brucella abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru e sua associação à cinética de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos – Revisão Sistemática e Meta-análise]. 2018. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Brucellosis is a zoonosis, caused by a bacterium from the genus *Brucella* that have in raw milk and dairy products an important route of transmission for man. Considering that bovine brucellosis is endemic in Brazil, and that the consumption of cheeses made with raw milk is a persistent habit, the organization of the available information becomes relevant, for the estimation of the risk associated with the consumption of this type of product in the future. The data were collected using systematic literature review, on the various factors that can modulate the survival of the bacteria in milk and cheese. The results obtained show that there are few data, especially quantitative, on the subject. Qualitative data were provided from 16 articles, 4 of which (9 different lab experiments) were used for quantitative analysis by meta-analysis, using the meta-regression method. The results detected the influence of curing time on the decrease of the bacterial population, also associated to reduced values of pH and water activity. Knowledge gaps about infectious dose, antagonistic/synergistic interactions from this agent with the natural cheese/milk microbiota and a lack of experimental data about the *Brucella* survival behavior in cheeses were also detected by this research. The obtaining of these data may facilitate the construction of models for predicting the survival of this agent in these products in the future.

Key-words: Brucellosis, food, cheese, survival, systematic review

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da Revisão Sistemática de literatura.....	21
Figura 2 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana em função do tempo de cura.....	31
Figura 3 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana em função do tempo de cura.....	31
Figura 4 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana em função do pH.....	33
Figura 5 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana em função do pH.....	33
Figura 6 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana em função da atividade de água (aW).....	35
Figura 7 - Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana em função da atividade de água (aW).....	35
Figura 8 - Gráficos das retas de meta-regressão simples inter-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana em função do tempo de cura, pH da atividade de água (aW) e temperatura.....	39
Figura 9 - Gráficos das retas de meta-regressão simples inter-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana em função do tempo de cura, pH da atividade de água (aW) e temperatura.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de artigos encontrados contendo dados qualitativos e quantitativos sobre *Brucella* spp em produtos lácteos, com autor e ano, país de procedência, tipo de artigo (revisão ou trabalho experimental), cepa principal estudada e característica principal dos dados apresentados (qualitativos ou quantitativos) em ordem cronológica.....22

Tabela 2 - Artigos contendo dados gerais qualitativos sobre *Brucella* spp e produtos lácteos com autor e ano de cada artigo, dados de porcentagem de vacas positivas que eliminam a bactéria pelo leite (% de vacas que eliminam), dados de carga eliminada, tempo de excreção pelo leite e risco de exposição humana pelo consumo de lácteos.....23

Tabela 3 - Artigos contendo dados pontuais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos com autor e ano, país de procedência, tipo de queijo, tempo de sobrevivência, concentração de sal (NaCl), pH, atividade de água (aW), temperatura de estocagem onde há sobrevivência (Temp.) e influência da porcentagem de gordura (Gordura).....24

Tabela 4 - Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano e identificação do experimento, período de estudo, número de amostras (N), produto e contagem de *Brucella* spp.....26

Tabela 5 - Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano e identificação do experimento, período de estudo, número de amostras (N), produto e contagem de *Brucella* spp.....26

Tabela 6 - Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e pH.....27

Tabela 7 - Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e pH.....28

Tabela 8 – Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e atividade de água.....28

Tabela 9 - Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano,

período de estudo, número de amostras (N) e atividade de água.....	28
--	----

Tabela 10 - Equações de regressão para modelos intra-estudo, da contagem bacteriana em função do tempo de cura de cada queijo, com autor e ano contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), o tempo de cura como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	29
---	----

Tabela 11 - Equações de regressão para modelos intra-estudo, da contagem bacteriana em função do pH de cada queijo, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), pH como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	32
--	----

Tabela 12 - Equações de regressão para modelos intra-estudo, da contagem bacteriana em função da atividade de água (aW) de cada queijo, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), a atividade de água (aW) como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	33
--	----

Tabela 13 - Equações de regressão múltipla para modelos intra-estudo, da contagem bacteriana em função do tempo de cura e da atividade de água (aw) de cada queijo produzido com leite cru, e tempo de cura, pH e atividade de água (aW) para os queijos produzidos com leite pasteurizado, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), e o tempo de cura, pH e atividade de água (aW) como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	36
--	----

Tabela 14 - Equações de meta-regressão simples para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite cru, da contagem bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	38
--	----

Tabela 15 - Equações de meta-regressão simples para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite pasteurizado, da contagem bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....	39
---	----

Tabela 16 - Equações de meta-regressão múltipla para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite cru e pasteurizado, da contagem bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.....41

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVO	18
3.MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 PROTOCOLO DA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	18
3.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA E LEVANTAMENTO DE DADOS	18
3.3 SELEÇÃO DOS ARTIGOS, EXTRAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DE QUALIDADE.....	19
3.4 META-ANÁLISE	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA.....	21
4.1.1 Síntese qualitativa	23
4.1.1.1 Associação entre <i>brucella</i> e produtos lácteos	23
4.1.1.2 Sobrevivência de <i>brucella</i> em queijos	24
4.1.1.3 Estudos experimentais sobre sobrevivência de <i>brucella</i> em queijos....	25
4.1.2 Síntese quantitativa - meta-análise.....	29
4.1.2.1 Modelos intra-estudo	29
4.1.2.1.1 Modelos de regressão simples	30
4.1.2.1.2 Modelos de regressão múltipla	36
4.1.2.2 Modelos de meta-regressão inter-estudo	37
4.1.2.2.1 Modelos de meta-regressão simples	37
4.1.2.2.2 Modelos de meta-regressão múltipla	40
5.0 DISCUSSÃO	41
5.1 SÍNTESE QUALITATIVA.....	41

5.2 SÍNTESE QUANTITATIVA, META-ANÁLISE.....	44
6.0 CONCLUSÃO	47
7.0 REFERÊNCIAS.....	48

1.Introdução

A Brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*, que podem infectar tanto animais quanto o homem, sendo considerada uma zoonose de distribuição universal, acarretando problemas sanitários e prejuízos econômicos importantes (BRASIL, 2006). A brucelose ainda não foi erradicada no Brasil como detectado por estudos recente da prevalência nacional (FERREIRA-NETO et al., 2016), e o controle da enfermidade é realizado de acordo com a Instrução Normativa nº 2 de 10 de janeiro de 2001, revista pela Instrução Normativa SDA nº10, de 03/03/2017, que implementou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

De acordo com os últimos estudos realizados no Brasil solicitados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a prevalência de animais soropositivos para Brucelose foi de 0,98% para o Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2016), 1,21% para Santa Catarina (BAUMGARTEN et al., 2016) e 1,7% para o Paraná (DIAS et al., 2009), estados que compõem a região sul do país; já para a região sudeste, os valores foram de 3,8% para o Espírito Santo (ANZAI et al., 2016), 0,81% para Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2016), 4,1% para o Rio de Janeiro (KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009) e 3,8% para São Paulo (DIAS et al., 2009); regiões estas que são as principais produtoras de leite no Brasil.

Em bovinos, a brucelose compromete o sistema reprodutivo causando abortamento no terço final da prenhez, endometrite crônica, metrite, subfertilidade e infertilidade. No macho pode causar vesiculite, orquite e epididimite, com aumento uni ou bilateral, subfertilidade ou infertilidade (DEL FAVA et al., 2003).

A transmissão da brucelose para o homem ocorre principalmente, pelo contato direto ou indireto com animais infectados. No entanto, a ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e derivados quando não processados termicamente (não pasteurizados) também são uma importante via de transmissão (OIE, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2001, estima-se que a cada ano surjam 500 mil novos casos

de brucelose humana no mundo, afetando principalmente pessoas envolvidas com a bovinocultura.

Dean et al (2012), em levantamento de dados feito com o uso de Revisão Sistemática de Literatura, estimou a incidência de brucelose humana no mundo usando dados do período de 1990-2010, onde foram detectadas incidências mais altas em países do Oriente Médio (entre 0,73-268,81 casos por 100,000 habitantes/ano), norte da África (0,28-70,00 casos por 100,000 habitantes/ano), África Sub-saariana (34,86 casos por 100,000 habitantes/ano), Ásia Central (88,00 casos para 100,000 habitantes/ano) e América Central e do Sul (12,84-25,69 por 100,000 habitantes/ano). Apesar de serem detectadas taxas mais baixas para países Europeus, países do mediterrâneo como a Grécia apresentaram taxas elevadas de incidência (4-32.49 casos para 100.000 habitantes/ano).

De acordo com o mesmo autor, a incidência da brucelose variou de forma ampla entre países e dentro de cada país, e muitas vezes devido a sistemas de notificação deficientes presentes nestes países, os valores encontrados para as taxas de incidência podem estar subestimados.

Após o contato com o agente, o período de incubação da doença em geral gira em torno de 1 a 3 semanas mas os primeiros sintomas podem surgir após meses. Os sintomas são em geral inespecíficos, e podem incluir febre, suores noturnos, debilidade, insônia, anorexia e dor de cabeça (Hasanjani Roush & Ebrahimpour, 2015). A doença pode ser subdividida em forma aguda, subaguda e crônica, a forma aguda sendo caracterizada por febre, sudorese e dor (artralgias, mialgias e cefaleia). Já a forma crônica tem evolução longa e é marcada por recidivas; a doença pode atingir qualquer órgão ou sistema, porém na forma crônica predomina em órgãos específicos, particularmente lesões ósteo-articulares, porém também podem provocar lesões no sistema-nervoso (meninges), uro-genital, hepato-biliar, cutâneo, hematológico, respiratório e oftalmológico (PESSEGUEIRO, 2003)

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose determina como as principais medidas de controle da enfermidade nos rebanhos são a vacinação de fêmeas de 3 a 8 meses e a eliminação de animais doentes. O controle da infecção ocupacional deve ser feito através de

educação em saúde e uso de equipamento de proteção individual sempre que possível. Para o controle da transmissão por via alimentar, deve-se enfatizar a importância da pasteurização do leite e seus derivados como forma de eliminação do agente transmissor da doença (OMS, 2001).

As bactérias do gênero *Brucella* spp, cocobacilos pequenos, gram-negativos, não formadores de esporos. São parasitas intracelulares facultativos, CO₂ dependentes, que invadem e se replicam em fagócitos. São em geral hospedeiro específicas, e as principais cepas envolvidas em infecções no homem são: *B.melitensis* (ovinos e caprinos), *B.abortus* (bovinos), *B.suis* (suínos), *B.neotomae* (roedores), *B.canis* (cães) e *B.ovis* (ovinos) (FDA, 2012).

As brucelas são consideradas medianamente sensíveis as condições ambientais (BRASIL, 2006) e podem permanecer viáveis no leite e produtos lácteos por 15 a 90 dias, dependendo das condições de temperatura, pH e da presença de microrganismos inibidores de sua multiplicação (SOLA et al., 2014).

No Brasil, o comércio de leite cru está proibido desde a década de 70, pelo decreto Nº 66.183, que também instituiu a obrigatoriedade da pasteurização do leite. A pasteurização torna-se não obrigatória apenas no caso de queijos curados por um período mínimo de 60 dias (BRASIL, 1996), e maturações inferiores a este período serão permitidas após a execução de estudos científicos que comprovem que a redução no tempo de maturação não compromete a inocuidade do produto de acordo com a Instrução Normativa Número 30, de 07 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013). Segundo a mesma Instrução Normativa, a produção destes queijos ficará restrita a região de indicação geográfica restrita e certificada ou tradicionalmente reconhecida em propriedades certificadas livres de brucelose e tuberculose.

Além das normas federais, existem normas estaduais específicas para cada produto, como as utilizadas para fiscalização de queijos do tipo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais, Leis Estaduais nº 19.492, 13 de janeiro de 2011 (MINAS GERAIS, 2011) que também estabelece o tempo de maturação para cada queijo produzido em cada região microrregião específica.

Apesar da legislação ainda não há estudos suficientes sobre a eficiência deste método para eliminação da *Brucella* em queijos. Alguns estudos antigos demonstraram a presença de *Brucella abortus* em queijos por períodos

prolongados, como o de Gilman et al (1946) no qual houve detecção em queijo tipo cheddar fabricado com leite experimentalmente contaminado após até seis meses de armazenamento.

No Brasil, o leite é considerado um dos principais alimentos consumidos pela população (VIDAL-MARTINS et al., 2013), e o consumo de queijos no país gira em torno de 2kg per capita/ano segundo dados do IBGE de 2013. A produção total de leite no Brasil para o ano de 2016 foi de 33,62 milhões de litros, sendo que destes 23,13 milhões de litros de leite sob inspeção, parte dessa produção sem inspeção poderia ser considerada leite informal (EMBRAPA, 2018). Produto este em geral utilizado dentro das próprias propriedades produtoras para alimentação das famílias e bezerros, ou para venda direta ao consumidor tanto do produto in-natura como derivados, sendo o queijo um dos principais produtos (ZOCCAL, 2014).

Devido às características epidemiológicas da doença no Brasil e ao fato de que ainda existe consumo de leite informal no país, bem como de produtos fabricados com leite sem pasteurização, torna-se relevante avaliar o risco de ocorrência de casos humanos de brucelose devido à transmissão por via alimentar. No entanto, como existem poucas informações publicadas no que tange a influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos do leite e do queijo, bem como do seu processo de transformação, sobre a cinética de multiplicação/morte desta bactéria, torna-se relevante a realização de levantamento e síntese de dados relacionados ao tema para dar suporte aos estudos relacionados à avaliação do risco de infecção de brucelose pelo consumo de queijo.

A Revisão Sistemática de Literatura é um método que promove uma visão geral das evidências existentes pertinentes a uma pergunta formulada previamente. Neste tipo de revisão, são utilizados métodos específicos e padronizados, de forma transparente, reprodutível, e rigorosamente baseada em evidências para identificar e analisar criticamente estudos relevantes e posteriormente coletar e analisar os dados provenientes destes estudos (EFSA, 2010).

A partir dos resultados obtidos pela revisão sistemática de literatura utiliza-se o procedimento estatístico conhecido como meta-análise para integrar os resultados facilitando a avaliação das evidências obtidas. Através da meta-

análise é possível resumir e revisar dados previamente existentes para a identificação de tendências (MCQUESTIN et al., 2009) permitindo a obtenção de resultados de maior relevância e confiabilidade.

2.Objetivo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um levantamento de dados com o uso da revisão sistemática de literatura e meta-análise, sobre fatores relacionados a infecção humana por *Brucella abortus* através do consumo queijos produzidos com leite cru e sua associação com a cinética de sobrevivência desta bactéria em queijos.

3.Material e Métodos

3.1 Protocolo da Revisão sistemática

Foi conduzida a busca por referências de acordo com os princípios definidos no modelo para execução de revisão sistemática de literatura para a área de alimentos da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Seguindo as seguintes etapas: definição da pergunta de pesquisa, definição da estratégia de busca, identificação de artigos, aplicação dos critérios de seleção, justificativa das exclusões e análise crítica dos artigos selecionados, síntese dos resultados e conclusão.

3.2 Estratégia de busca e Levantamento de dados

A pergunta estabelecida foi: “Qual o risco de infecção humana por *B.abortus* pelo consumo de queijo elaborado com leite cru?”, tendo como foco os processos produtivos de queijos feitos com leite cru desde a coleta do leite nas fazendas, processamento inicial de produção do queijo fresco e cura.

A partir destes critérios, foram definidas as palavras chaves utilizadas na pesquisa: *B.abortus*, brucelose humana, brucelose animal, queijo, risco, dose

infectante, dose-resposta, leite. As bases de dados selecionadas para a pesquisa foram as seguintes: Scopus, PubMed, Embase, Web of Science, Wiley Library e Scielo, além da pesquisa em bases de dados, também foram incluídos dados relevantes encontrados em livros, e quando utilizados dados provenientes de experimentos, os dados foram referenciados ao autor original. Não foram incluídas bases de dados de teses e dissertações, optando-se pelo uso apenas de dados publicados. Os idiomas selecionados para a pesquisa foram: inglês, espanhol e português. Não foi definido ano de publicação. O tipo de design do estudo foi uma revisão sistemática quali/quantitativa

Foram feitas diversas combinações de palavras chaves dentro das bases de dados e de acordo com a abrangência dos resultados obtidos, sendo a melhor combinação: "*B.abortus* OR *brucella abortus* OR *brucella* OR brucellosis AND cheese OR milk AND human".

3.3 Seleção dos Artigos, Extração dos Dados e Análise de Qualidade

Os artigos foram organizados com um gerenciador de referências comercial (Mendeley®) e foram selecionados aplicando-se os seguintes critérios de exclusão:

- Somente descreviam casos clínicos
- Não estavam associados ao consumo de alimentos contaminados,
- Abordavam brucelose em outras espécies animais
- Focados em métodos de diagnóstico ou tratamentos
- Não traziam nenhuma informação sobre como se dá a contaminação do leite (modo de excreção da bactéria pelo animal infectado, vias de eliminação do agente, carga eliminada) a ser utilizado na elaboração de queijos,
- Artigos sem acesso pela rede da USP (base CAB direct)

A aplicação dos critérios de exclusão se deu em etapas. Inicialmente foram removidos todos os artigos em duplicata, em seguida foram selecionados somente pela triagem dos títulos aqueles que eram relevantes, destes artigos foi feita a triagem a partir dos resumos, aqueles que restaram foram lidos na íntegra e os que estavam fora dos critérios de exclusão permaneceram para terem seus

dados utilizados. Durante a leitura integral dos artigos, também foi feita avaliação de qualidade, observando-se as referências utilizadas por cada autor, relevância da publicação, adequação ao tema da pesquisa, e no caso de estudos experimentais, o delineamento experimental, amostragem e resultados obtidos.

Após a seleção dos artigos, foi realizada uma síntese qualitativa dos dados.

3.4 Meta-Análise

Os dados quantitativos levantados a partir de estudos com delineamento experimental semelhante foram utilizados para a realização de meta-análise. O método utilizado foi o de meta-regressão com o uso do software estatístico R®, utilizando os pacotes ggplot2, gridExtra e ggthemes para construção dos gráficos. Os modelos foram construídos tendo como variável dependente a contagem/população de *Brucella abortus* e como independentes pH, atividade de água, tempo de cura e temperatura observados por cada estudo.

Inicialmente foi realizada uma análise de regressão simples com os dados dentro de cada estudo encontrado, para cada uma das três variáveis independentes. Neste primeiro momento, por serem as temperaturas de cura constantes dentro de cada estudo, não foi realizada análise de regressão para esta variável isoladamente. Em seguida, foi feita análise de regressão múltipla, para cada estudo individualmente.

Após serem feitas as análises de cada estudo individual, foram repetidas as análises de regressão simples e múltipla, porém envolvendo todos os estudos, desta vez incluindo-se a temperatura como variável independente, pois as mesmas eram diferentes entre os estudos. A partir dos resultados, foram definidos quais modelos mais adequados sobre o comportamento de sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos e análise crítica dos resultados.

4. Resultados

4.1 Revisão sistemática

A partir de critérios pré-estabelecidos, a pesquisa retornou um total de 3448 artigos, sendo 479 da base Scopus, 485 da base PubMed, 203 da base Web of Science, 11 da base Scielo, 1690 da base Wiley Library, 577 da base Embase e 3 artigos de livro. Houve uma redução paulatina do número de artigos com a aplicação sequencial dos critérios de exclusão: após a remoção das duplicatas pelo gerenciador de referências, restaram 1906; após a triagem de títulos e resumo levando-se em consideração a presença das palavras chaves restaram 122 artigos que após a leitura na íntegra com o uso dos critérios de exclusão resultaram em 16. Para a análise quantitativa dos dados, foram selecionados 4 artigos totalizando 9 estudos experimentais, com padrão de seleção semelhante.

O processo utilizado na revisão sistemática e os resultados encontrados em cada etapa estão expostos na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma da Revisão Sistemática de literatura.

A Tabela 1 sumariza os trabalhos encontrados com autor e ano, país, tipo de cepa estudada e tipo de dado apresentado. Houve artigos de vários países, com predomínio de países desenvolvidos em sua maioria, artigos de revisão narrativa com dados qualitativos sobre o tema.

Tabela 1. Total de artigos encontrados contendo dados qualitativos e quantitativos sobre *Brucella* spp em produtos lácteos, com autor e ano, país de procedência, tipo de artigo (revisão ou trabalho experimental), cepa principal estudada e característica principal dos dados apresentados (qualitativos ou quantitativos) em ordem cronológica.

Autor e Ano	País	Tipo de artigo	Cepa principal	Dados qualitativos ou quantitativos
GILMAN, H.L; 1946	EUA	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Quali/Quantitativos
OGG, J.S; 1952	Irlanda	Revisão	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
SMITH, J; 1956	Escócia	Revisão	<i>Brucella abortus/melitensis</i>	Qualitativos
ALTON, G.G; 1974	Australia	Revisão	<i>Brucella abortus/melitensis</i>	Qualitativos
SOUZA, A.P; 1977	Brasil	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
PLOMMET, 1988	França	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Quantitativos
ICMSF, 1996	Reino Unido	Revisão	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
LANGONI, H; 2000	Brasil	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
SREEVATSAN, S; 2000	EUA	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
RYSER, E.T; 2001	EUA	Revisão	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
CAPARELLI, R; 2009	Itália	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
ROWE, M.T; 2014	Reino Unido	Revisão	<i>Brucella abortus</i>	Qualitativos
KARA & AKKAYA, 2014	Turquia	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Quantitativos
VERRAES, C. 2015	Bélgica	Revisão	<i>Brucella abortus/melitensis</i>	Qualitativos
SANTIAGO-RODRIGUEZ, 2015	México	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Quantitativos
STARIKOFF, 2016	Brasil	Experi.	<i>Brucella abortus</i>	Quantitativos

Experi. = experimental

4.1.1 Síntese qualitativa

4.1.1.1 Associação entre *Brucella* e Produtos Lácteos

Os estudos foram em seguida agrupados de acordo com o tipo de dado e organizados nas tabelas 2 a 9 a seguir.

A tabela 2 traz dados gerais sobre *Brucella abortus* e produtos lácteos contendo informações sobre carga de agente eliminada no leite, padrão de excreção (contínuo/intermitente), porcentagem de animais que positivos para brucelose que eliminam a bactéria pelo leite, risco de exposição humana à doença pelo consumo de leite e produtos lácteos fabricados com o leite infectado e dados sobre gravidade do risco/ dose infectante quando existiam.

Tabela 2. Artigos contendo dados gerais qualitativos e quantitativos pontuais sobre *Brucella spp* e produtos lácteos com autor e ano de cada artigo, dados de porcentagem de vacas positivas que eliminam a bactéria pelo leite (% de vacas que eliminam), dados de carga eliminada, tempo de excreção pelo leite e risco de exposição humana pelo consumo de lácteos.

Autor e Ano	% de vacas + que eliminam	Carga eliminada	Tempo de excreção	Risco de Exposição
OGG, J.S; 1952	-	Alta inicialmente reduz na lactação(não definida pelo autor)	Semanas a anos	Sim. Consumo de leite cru.
SMITH, J; 1956	-	-	-	Sim. Risco relativo para queijos.
ALTON, G.G; 1974	-	-	Anos	Sim. Dose infectante alta
<u>SOUZA, A.P; 1977</u>	-	-	Anos	Sim.
ICMSF, 1996	12-44%	Até 5 x 10 ⁵ UFC/ml média >10 ⁴	Anos, repete a cada lactação	Sim. Dose infectante indeterminada
<u>LANGONI, H; 2000</u>	30,61%	-	Meses a anos	Sim
<u>SREEVATSAN, S; 2000</u>	25%	-	250 dias ou mais	Sim

RYSER, E.T; 2001	-	15 x 10 ³ UFC/ml	5 meses a anos. Intermitente	Sim. Associado a lácteos.
<u>CAPARELLI, R; 2009</u>	17%	10 ³ – 10 ⁴ UFC/ml	3 meses. Intermitente	Sim
ROWE, M.T; 2014	-	-	-	Sim. Dose infectante 10 a 100 células (inalação).
VERRAES, C. 2015	-	-	-	Sim. Associado a queijo.

Todos os trabalhos de revisão encontrados consideraram a existência de risco de exposição humana ao agente após o consumo de queijos ou produtos lácteos em geral preparados com leite cru.

As informações de porcentagem de animais infectados que eliminam pelo leite, carga eliminada e tempo de excreção, foram extraídas de artigos experimentais (artigos grifados na tabela), em que a eliminação do agente foi estudada em animais experimentalmente infectados. Já os dados destes tópicos que foram trazidos por artigos de revisão (ICMSF 1996 e RYSER 2001) também são baseados em dados experimentais utilizados como referências por estes autores (LERCHE & LORENZEN, 1932; RAMMEL, 1967), referências estas que não foram detectadas na revisão provavelmente por serem mais antigas.

4.1.1.2 Sobrevivência de *Brucella* em queijos

A tabela 3 apresenta dados sobre sobrevivência de *Brucella abortus* em diferentes tipos de queijos e de condições de pH, atividade de água, concentração de sal, porcentagem de gordura e temperatura de estocagem.

Tabela 3. Artigos contendo dados pontuais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos com autor e ano, país de procedência, tipo de queijo, tempo de sobrevivência, concentração de sal (NaCl), pH, atividade de água (aW), temperatura de estocagem (°C) onde há sobrevivência (Temp.) e influência da porcentagem de gordura (Gordura).

Autor e Ano	Tipo de Queijo	Tempo de sobrevivência	NaCl	pH	aW	Temp.	Gordura
GILMAN, H.L; 1946	Cheddar	6 meses	-	-	-	4,4	Gordura prolonga a sobrevivência

ICMSF, 1996	Diversos	Variável, Depende do tipo de queijo	2,3% a 27%	5,8 limite inferior. Ideal 6,6- 7,4	-	-40 a 37	
RYSER, 2001			-	-	-	-	-
*Kästli & Hausch, 1957	Emmental	6 dias					
*Kästli & Hausch, 1957	Gruyere	6 dias					
* Kästli & Hausch, 1957	Tilsit	15 dias					
*Kästli & Hausch, 1957	Cammebert	57 dias					
*Rammel, 1967	Pecorino	90 dias					
*King, 1957	Roquefort	90 dias					
*Diaz Cinco, 1994	Queijo estilo mexicano	21 dias					
ROWE, 2014	Diversos		2,3% a 27%	Ótimo 7,2	6 dias em queijos duros	-40 a 37	Gordura prolonga a sobrevivên cia
*Kästli & Hausch, 1957	Emmental	6 dias					
*Kästli & Hausch, 1957	Gruyere	6 dias					
*Kästli & Hausch, 1957	Tilsit	15 dias					
*Kästli & Hausch, 1957	Cammebert	57 dias					

**Referências originais dos dados levantados pela revisão.*

Os estudos agrupados na tabela anterior são todos trabalhos de revisão, que basearam seus dados em estudos experimentais ou não publicados anteriormente (os autores originais estão referenciados nas tabelas bem como cada tipo de queijo estudado), exceto Gilman, 1946. Os dados apresentados em cada um são utilizados com referência ao autor original.

4.1.1.3 Estudos Experimentais sobre Sobrevivência de *Brucella* em queijos

Nas tabelas 4 a 9 encontram-se estudos experimentais que produziram

queijos utilizando leite cru ou pasteurizado inoculado com *Brucella abortus* onde foi analisada a sobrevivência durante a cura, em função da temperatura, do pH e da atividade de água respectivamente. Todas as tabelas se referem aos mesmos estudos.

Devido as diferenças presentes nos tempos de coleta de dados dentre os experimentos que utilizaram leite cru ou pasteurizado, os resultados encontrados por cada autor foram agrupados em tabelas distintas, de acordo com o tipo de tratamento dado ao leite antes da inoculação das bactérias. Na tabela 4 estão os dados de contagem/população de *Brucella abortus* utilizadas nos experimentos que utilizaram leite cru na produção dos queijos com os respectivos valores de temperatura de cura e na tabela 5 encontram-se os mesmos dados para os experimentos feitos com leite pasteurizado.

Tabela 4. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano e identificação do experimento, período de estudo, número de amostras (N), produto e contagem de *Brucella* spp.

Autor	Periodo	N	Produto	Leite	QF	Q7	Q15	Q30	T
Plommet, 1988	32 dias	3	Queijo camembert	3,71	4,44	2,46	1,78	0,00	12
Kara & Akkaya, 2014 (1)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	4,00	3,00	2,34	0,00	0,00	18
Kara & Akkaya, 2014 (2)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	6,20	5,00	3,20	2,30	0,00	18
Santiago-Rodriguez, 2015 (1)	7 dias	3	Queijo fresco tipo mexicano	8,78	7,48	4,50	-	-	4
Santiago-Rodriguez, 2015 (2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	9,08	8,00	4,85	4,00	0,00	4
Santiago-Rodriguez, 2015 (3)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	9,08	7,95	4,00	3,00	0,00	24

Leite: Contagem de *B.abortus* inculada no leite (log UFC/ml), QF: Contagem de *B.abortus* no queijo fresco log UFC/g, Q7, Q15, Q30: Contagem de *B.abortus* no queijo curado por 7, 15, e 30 dias log UFC/g respectivamente, T: temperatura de cura em °C.

Tabela 5. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano e identificação do experimento, período de estudo, número de amostras (N), produto e contagem de *Brucella* spp.

Autor	Periodo	N	Produto	Leite	QF	Q7	Q14	Q21	Q29	Q30	T
-------	---------	---	---------	-------	----	----	-----	-----	-----	-----	---

Santiago-Rodriguez, 2015 (2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	9,08	6,78	5,60	4,90	4,30	3,00	2,00	4
Santiago-Rodriguez, 2015 (3)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	9,08	6,81	5,60	4,70	3,48	2,30	3,00	24
Starikoff, 2016	63 dias	3	Queijo tipo parmesão	5,80	5,40	3,9	2,40	1,30	0,00	0,00	18

Leite: Contagem de *B.abortus* inculada no leite (log UFC/ml), QF: Contagem de *B.abortus* no queijo fresco log UFC/g, Q7, Q14, Q21, Q29, Q30: Contagem de *B.abortus* no queijo curado por 7 dias, 14, 21, 29 e 30 dias log UFC/g respectivamente, T: temperatura de cura em °C

Os estudos foram realizados de forma semelhante, tendo como diferenças principais entre eles a contagem/população inicial de *Brucella abortus*, inoculada no leite antes do preparo dos queijos, o tipo de queijo utilizado, temperatura de cura e a pasteurização prévia do leite, antes de ser feita a inoculação das bactérias. Foram utilizados queijo tipo Camembert (Plommet, 1988), Afyon tulum (Kara & Akkaya, 2014; experimentos 1 e 2), queijo fresco e curado tipo mexicano (Santiago & Rodriguez, 2015, experimentos número 1 a 3 leite cru, e 2 e 3, leite pasteurizado) e parmesão (Starikoff, 2016).

Os estudos utilizaram populações iniciais que variaram de 3,71 a 9,08 log UFC/ml de leite, e temperatura de cura entre 4 e 24°C. Para os queijos de leite cru, as contagens bacterianas utilizadas foram realizadas nos tempos 1 (queijo fresco, recém-fabricado), 7 (7 dias de cura), 15 (quinze dias de cura) e 30 (30 dias de cura). Para aqueles preparados com leite pasteurizado previamente, foram utilizados os tempos 1 (queijo fresco, recém-fabricado), 7 (7 dias de cura), 14 (quinze dias de cura), 21 (21 dias de cura), 29 (29 dias de cura) e 30 (30 dias de cura).

As tabelas 6, 7, 8 e 9 a seguir, apresentam os valores de pH (tabela 6 leite cru, tabela 7 leite pasteurizado) e de atividade de água (tabela 8 leite cru e tabela 9 leite pasteurizado) encontrados nos estudos descritos anteriormente.

Tabela 6. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e pH.

Autor	Periodo	N	Produto	Leite	QF	Q7	Q15	Q30
Plommet, 1988	32 dias	3	Queijo camembert	6,51	4,56	5,50	4,91	5,50

Kara & Akkaya, 2014 (1)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	6,65	5,67	5,51	5,46	5,37
Kara & Akkaya, 2014 (2)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	6,66	5,68	5,52	5,48	5,38
Santiago-Rodriguez, 2015 (1)	7 dias	3	Queijo fresco tipo mexicano	7,00	6,00	5,00	-	-
Santiago-Rodriguez, 2015 (2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	7,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Santiago-Rodriguez, 2015 (3)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	7,00	5,00	5,00	4,00	4,00

Leite: pH inicial no leite, QF: pH no queijo fresco, Q7, Q15, Q30: pH no queijo curado por 7 dias, 15 dias, e 30 dias respectivamente.

Tabela 7. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e pH.

Autor	Periodo	N	Produto	Leite	QF	Q7	Q14	Q21	Q29	Q30
Santiago-Rodriguez, 2015 (2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	7,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Santiago-Rodriguez, 2015 (3)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	7,00	5,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Starikoff, 2016	63 dias	3	Queijo tipo parmesão		5,57	5,26	5,27	5,11	4,98	

Leite: pH inicial no leite, QF: pH no queijo fresco, Q7, Q14, Q21, Q29 e Q30: pH no queijo curado por 7, 14, 21, 29 e 30 dias respectivamente.

Tabela 8. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite cru contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N), atividade de água.

Autor	Periodo	N	Produto	QF	Q7	Q15	Q30
Plommet, 1988	32 dias	3	Queijo camembert	-	-	-	-
Kara & Akkaya, 2014 (1)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	0,920	0,890	0,880	0,870
Kara & Akkaya, 2014 (2)	90 dias	1	Queijo Afyon tulum	0,920	0,890	0,880	0,870
Santiago-Rodriguez, 2015 (1)	7 dias	3	Queijo fresco tipo mexicano	0,959	0,930	-	-
Santiago-Rodriguez, 2015(2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	0,980	-	0,906	0,890

QF: atividade de água no queijo fresco, Q7, Q15, Q30: atividade de água no queijo curado por 7 dias, 15 dias, e 30 dias respectivamente.

Tabela 9. Artigos contendo dados experimentais sobre sobrevivência de *Brucella* spp em queijos produzidos com leite pasteurizado contendo autor e ano, período de estudo, número de amostras (N) e atividade de água.

Autor	Período	N	Produto	QF	Q7	Q14	Q21	Q29	Q30
Santiago-Rodriguez, 2015 (2)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	0,98	0,93	0,92	0,92	0,92	0,90
Santiago-Rodriguez, 2015 (3)	30 dias	3	Queijo tipo mexicano	0,99	0,94	0,93	0,91	0,90	0,89
Starikoff, 2016	63 dias	3	Queijo tipo parmesão	0,98	0,99	0,98	0,98	0,98	

QF: atividade de água no queijo fresco, Q7, Q14, Q21, Q29 e Q30: atividade de água no queijo curado por 7, 14, 21, 29 e 30 dias respectivamente.

Os valores de pH variaram entre os estudos, provavelmente devido as diferenças entre os processos produtivos dos queijos, porém todos apresentaram redução entre o valor inicial e final detectados, exceto em um dos experimentos de Santiago-Rodriguez (2015), no qual o pH se manteve igual. As mensurações foram realizadas nos mesmos tempos das contagens bacterianas.

A atividade de água também modula a sobrevivência bacteriana. Valores de atividade de água reduzidos geralmente controlam o crescimento microbiano e os microrganismos possuem valores ótimos e níveis mínimos de atividade de água para crescimento (CHIRIFE; BUERA, 1996). É possível observar que em todos os queijos estudados apresentados na tabela 6 houve redução nos valores de atividade de água. As mensurações foram realizadas nos mesmos tempos das contagens bacterianas.

4.1.2 Síntese Quantitativa - Meta-análise

4.1.2.1 Modelos Intra-estudo

Os resultados encontrados para cada modelo de regressão linear simples para cada estudo individualmente (intra-estudo), da contagem bacteriana em função das variáveis tempo de cura, pH e atividade de água encontram-se nas tabelas 10 a 12 a seguir e os gráficos com as retas de regressão para cada

estudo em função de cada variável estão expostos abaixo nas figuras 2 a 7.

Devido as diferenças microbiológicas e físico-químicas que existem entre leite e queijo, foram utilizados apenas os dados dos queijos para os cálculos dos modelos de regressão.

4.1.2.1.1 Modelos de regressão simples

Tabela 10. Equações de regressão para modelos intra-estudo, da população bacteriana em função do tempo de cura de cada queijo, com autor e ano, contagem (concentração) bacteriana como variável dependente (Eixo y), o tempo de cura como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Autor e ano	Eixo y	Eixo x	Equação de Regressão Linear	R^2	p-valor
Plommet, 1988 Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 4.03 - 0.14x$	0.89	0.03
Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 2.77 - 0.10x$	0.63	0.12
Kara & Akkaya, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 4.78 - 0.16x$	0.95	0.01
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 7.61 - 0.25x$	0.93	0.02
Santiago & Rodriguez, 2015 (3) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 7.02 - 0.24x$	0.84	0.05
Santiago & Rodriguez, 2015 (1) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$Y = 6.72 - 0.12x$	0.98	7.032e-05
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de Cura	$6.88 - 0.16x$	0.99	2.646e-06

Starikoff, 2016 Past	Contagem de <i>Brucella</i> <i>abortus</i>	Tempo de Cura	$5.28 - 0.18x$	0.98	4.763-05
---------------------------------	--	------------------	----------------	------	----------

Cru: Experimento com leite cru, *Past*: Experimento com leite pasteurizado.

Figura 2. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana (concentração) em função do tempo de cura.

Figura 3. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana (concentração) em função do tempo de cura.

Não foi possível a análise de regressão linear para o estudo de Santiago & Rodriguez, 2015 feito com queijo fresco (experimento 1), porque o artigo apresentava apenas dois valores de contagem, no caso para o tempo 1 e para o tempo 7, inviabilizando o cálculo do modelo.

Observa-se que os coeficientes de determinação R^2 para os modelos contagem da *Brucella* pelo tempo de cura foram altos, sendo mais baixo no modelo obtido de “Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru”, independente se o leite utilizado foi cru ou pasteurizado, e quase todos os modelos deram resultados significativos ($p < 0,05$), exceto também o modelo obtido de “Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru”.

Tabela 11. Equações de regressão para modelos intra-estudo, da população/contagem bacteriana em função do pH de cada queijo, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), pH como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Autor e ano	Eixo y	Eixo x	Equação de Regressão Linear	R^2	p-valor
Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = -58.94 + 10x$	0.66	0.11

Kara & Akkaya, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = -87.18 + 16x$	0.93	0.02
Santiago & Rodriguez, 2015 (3) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = -16.40 + 4.47x$	0.42	0.21
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = -9.16 + 3.19x$	0.34	0.13
Starikoff, 2016 Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = -45.53 + 9.18x$	0.88	0.01

Cru: Experimento com leite cru, Past: Experimento com leite pasteurizado.

Figura 4. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana (concentração) em função do pH.

Figura 5. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana (concentração) em função do pH.

No caso do pH, não foram possíveis cálculos para os experimentos de Santiago & Rodriguez 2015, para os experimentos 1 com queijo fresco (apresentava apenas dois pontos), e experimento 2, com queijo de leite cru curado a 4 graus (pH constante) e experimento 1 com leite pasteurizado.

Observa-se que para o pH os resultados de R^2 variaram, alguns estudos com valor elevado (Kara & Akkaya 2 e Starikoff) indicando boa adequação do modelo, e outros com valor mais baixo (Santiago & Rodriguez 3 com leite cru e 2 com leite pasteurizado).

Tabela 12. Equações de regressão para modelos intra-estudo, da contagem/população bacteriana em função da atividade de água (aW) de cada queijo, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), a atividade de água (aW) como variável independente (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Autor e ano	Eixo y	Eixo x	Equação de Regressão Linear	R^2	p-valor
Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -55.88 + 64x$	0.68	0.11
Kara & Akkaya, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -78.11 + 90x$	0.83	0.05
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -50.77 + 59x$	0.59	0.14
Santiago & Rodriguez, 2015 (3) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -45.18 + 53x$	0.79	0.07
Santiago & Rodriguez, 2015 (1) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -39.0 + 46x$	0.66	0.02
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -42.51 + 50.35x$	0.90	0.002

Starikoff, 2016 Past	Contagem de <i>Brucella</i> <i>abortus</i>	aW	$Y = -183.5 + 189.8x$	-0.21	0.63
---------------------------------	--	----	-----------------------	-------	------

Cru: Experimento com leite cru, *Past*: Experimento com leite pasteurizado.

Figura 6. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana (concentração) em função da atividade de água (aW).

Figura 7. Gráficos das retas de regressão linear intra-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana (concentração) em função da atividade de água (aW).

Para a atividade de água, não foi possível o cálculo para os estudos de Plommet, 1988 (não mensurou esta variável) e Santiago & Rodriguez, 2015 (apresentava apenas dois valores de atividade de água inviabilizando o cálculo do modelo).

Os valores de R^2 foram em geral altos, indicando boa adequação ao modelo de regressão utilizado. Com exceção ao estudo de Starikoff, 2016, o qual é possível verificar pelo gráfico a presença de alguns pontos discrepantes diferentemente dos outros modelos. Dentre todos os modelos, apenas dois apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$), os dois estudos de Santiago & Rodriguez, 2015 com leite pasteurizado.

4.1.2.1.2 Modelos de regressão múltipla

Os resultados encontrados para cada modelo de regressão linear múltipla para cada estudo individualmente (intra-estudo), da contagem bacteriana em função das variáveis tempo de cura, pH e atividade de água encontram-se na tabela 13 a seguir.

Tabela 13. Equações de regressão múltipla para modelos intra-estudo, da contagem/população bacteriana em função do tempo de cura e da atividade de água (aw) de cada queijo de leite cru e tempo de cura, atividade de água e pH para queijo de leite pasteurizado, com autor e ano, contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), e o tempo de cura, pH e atividade de água (aW) como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Autor e ano	Eixo y	Eixo x	Equação de Regressão Linear	R^2	p-valor
Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW	$Y = -32.48 - 0.04x_1 + 38.74x_2$	0.46	0.465
Kara & Akkaya, 2015 (2) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW	$Y = -23.36 - 0.11x_1 + 26.05x_2$	0.98	0.06

Santiago & Rodriguez, 2015 (3) Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW	$Y = -18.05 - 0.14x_1 + 26.05x_2$	0.87	0.2
Santiago & Rodriguez, 2015 (1) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW x pH	$Y = -2.76 - 0.12x_1 + 1.67x_2 + 1.60x_3$	0.98	0.007
Santiago & Rodriguez, 2015 (2) Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW x pH	$Y = -11.59 - 0.11x_1 + 21.67x_2 - 0.58x_3$	0.99	0.0006
Starikoff, 2016 Past	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x pH x aW	$Y = -97.10 - 0.10x_1 + 4.18x_2 + 80.88x_3$	0.98	0.06

Cru: Experimento com leite cru, Past: Experimento com leite pasteurizado.

Os modelos múltiplos foram calculados apenas para os estudos com os quais foi possível o cálculo de modelos simples para pelo menos 2 variáveis. O posicionamento de cada variável na fórmula deu-se de acordo com os valores de p encontrados nos modelos de regressão simples. Observa-se que com exceção do modelo feito para Kara & Akkaya, 2015 (1) Cru, todos os modelos apresentaram valores de R^2 altos, acima de 0.8. Apesar da boa adequação dos modelos, apenas dois foram significativos ($p < 0,05$), os dois estudos de Santiago & Rodriguez, 2015 com leite pasteurizado.

4.1.2.2 Modelos de meta-regressão inter-estudo

4.1.2.2.1 Modelos de meta-regressão simples

Por se tratarem de estudos feitos com diferentes tipos de queijo, foi considerado que existe variabilidade entre os resultados apresentados por cada autor. Os processos produtivos são semelhantes, tendo todos os queijos passado por processos de pré-aquecimento, uso de cultura starter, imersão em salmoura, entre outros. A princípio a diferença principal considerada foi a microbiota pré-existente no leite cru que pode exercer influência sobre a sobrevivência da *Brucella* nos produtos. Devido a este fato e as diferenças entre os tempos de coleta entre os estudos feitos com leite cru e leite pasteurizado,

optou-se por realizar uma meta-regressão para os queijos de leite cru e outra para os queijos de leite pasteurizado.

As análises de meta-regressão inter-estudo deram-se da mesma maneira que as análises de regressão feitas para cada estudo individualmente. A contagem bacteriana entrou como variável dependente, os fatores pH, atividade de água, e tempo de cura entraram como variáveis independentes. Dentre os estudos usados na meta-regressão, cada autor utilizou uma temperatura de cura diferente para cada queijo. Então para calcular o possível efeito da temperatura sobre a concentração bacteriana, também foram calculados modelos com a temperatura como variável independente.

Os modelos calculados para cada variável independente, com as equações de regressão, valores de R^2 e p-valor estão abaixo nas tabelas 14 e 15 acompanhadas dos respectivos gráficos para cada modelo que nas figuras 8 e 9 respectivamente.

Tabela 14. Equações de meta-regressão simples para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite cru, da contagem/população bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Eixo y	Eixo x	Equação de Meta-Regressão	R^2	p-valor
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de cura	$Y = 5.53 - 0.19x$	0.67	1.519-e06
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = 2.47 + 0.12x$	-0.04	0.895
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -50.22 + 58.82x$	0.81	2.151e-07
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Temperatura	$Y = 2.29 + 0.016x$	-0.04	0.829

Figura 8. Gráficos das retas de meta-regressão simples inter-estudo para queijos fabricados com leite cru, para contagem bacteriana (concentração) em função do tempo de cura, pH da atividade de água (aW) e temperatura.

No caso dos modelos de meta-regressão simples, para cada variável independente para queijos fabricados com leite cru, observa-se que os modelos que melhor se adequaram foram os de tempo de cura e atividade de água, ambos com valor de R^2 mais altos, e pelos gráficos, sem a presença de pontos discrepantes. Ambos os modelos foram significativos.

Tabela 15. Equações de meta-regressão simples para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite pasteurizado, da população bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Eixo y	Eixo x	Equação de Meta-Regressão	R^2	p-valor
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo de cura	$Y = 6.29 - 0.15x$	0.68	1.451-e05

Contagem de <i>Brucella abortus</i>	pH	$Y = 2.67 + 0.24x$	-0.06	0.793
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	aW	$Y = -4.14 + 8.47x$	-0.03	0.540
Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Temperatura	$Y = 4.39 - 0.04x$	-0.01	0.414

Figura 9. Gráficos das retas de meta-regressão simples inter-estudo para queijos fabricados com leite pasteurizado, para contagem bacteriana (concentração) em função do tempo de cura, pH da atividade de água (aW) e temperatura.

Os modelos de meta-regressão simples, para cada variável independente para queijos fabricados com leite pasteurizado, foram semelhantes aos obtidos com os dados de leite cru, porém apenas o modelo de tempo de cura adequou-se, com valor de R^2 maior e significativo.

4.1.2.2.2 Modelos de meta-regressão múltipla

Os resultados encontrados para cada modelo de meta-regressão linear múltipla da população bacteriana em função das variáveis tempo de cura, pH,

atividade de água e temperatura encontram-se na tabela 16 a seguir. Foram calculados dois modelos, um para os dados dos queijos de leite cru e outro para os dados de leite pasteurizado.

Tabela 16. Equações de meta-regressão múltipla para modelos inter-estudo para queijos produzidos com leite cru e pasteurizado, da população bacteriana em função do tempo de cura dos queijos, pH, atividade de água (aW) e temperatura de cura, com a contagem bacteriana como variável dependente (Eixo y), tempo de cura, pH, atividade de água (aW) e temperatura como variáveis independentes (Eixo x), equação da reta de meta-regressão, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor.

Tipo de Leite utilizado	Eixo y	Eixo x	Equação de regressão múltipla	R^2	p-valor
Leite Cru	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x aW x temperatura x pH	$-26.52 - 0.11x_1 + 41.2x_2 - 0.02x_3 - 1.19x_4$	0.88	8.212e-07
Leite Pasteurizado	Contagem de <i>Brucella abortus</i>	Tempo x temperatura x aW x pH	$-32.57 - 0.20x_1 - 0.04x_2 - 24.14x_3 - 0.4x_4$	0.87	3.632e-06

Ambos os modelos foram significativos, com valores de R^2 acima de 0.8 indicando boa adequação. A ordem das variáveis na equação deu-se pelos valores de p obtidos nos modelos simples.

5.0 Discussão

5.1 Síntese Qualitativa

Apesar de todos os artigos indicarem a existência do risco de infecção pelo consumo de produtos lácteos feitos com leite cru, poucos falavam sobre a magnitude deste risco com dados de dose infectante. Dados como os apresentados por Alton et al, 1974 o qual afirma ser a dose infectante alta, eram empíricos, aparentemente sem embasamento experimental. A comissão internacional para especificações microbiológicas em alimentos (ICMSF, 1996) reporta a dose infectante como indeterminada. O único dado contundente apresentado foi o de ROWE, 2014 com a dose infectante de 10 a 100 células, porém para inalação do agente, não para casos de ingestão; a fonte utilizada por este autor foi o Center for Disease and Control Prevention (CDC) Norte Americano o qual reportou o dado.

Observa-se também que existem poucos dados relativos a carga

bacteriana eliminada pelos animais infectados e porcentagem de animais infectados que eliminam a *Brucella* pelo leite. Foram encontrados apenas 3 artigos que ofereciam dados de carga eliminada (ICMSF, 1996; RYSER, 2001 e CAPARELLI, 2009) com valores dentro do mesmo intervalo entre 10^3 e 10^4 UFC/ml. Ryser e ICMSF por serem revisões utilizaram dados identificados por outros autores no caso Rammel, 1967 e Schaal, 1958 respectivamente. E 3 trabalhos de porcentagem de animais (LANGONI, 2000; SREEVATSAN, 2000 e CAPARELLI, 2009) com valores entre 12 e 44%.

O conhecimento de valores aproximados de carga bacteriana eliminada bem como da estimativa da porcentagem de animais que quando infectados eliminam a bactéria durante a lactação são essenciais para os cálculos da carga final bacteriana presente em produtos lácteos elaborados com leite infectado. A falta de dados sobre estes dois pontos pode dificultar a estimativa dos riscos de contaminação do produto final.

A dificuldade da execução de experimentos com animais infectados devido ao alto risco representado pela Brucelose, pode ser uma justificativa para a falta de estudos relacionados ao tema.

De acordo com Ryser, a sobrevivência da *Brucella* por longos períodos de tempo em queijos é relatada desde os anos 40. As diferenças nos processos de fabricação de cada queijo provavelmente influenciam no tempo de sobrevivência, pois cada queijo possui características físico-químicas e microbiológicas específicas. A sobrevivência da *Brucella* está intimamente relacionada a determinados fatores intrínsecos e extrínsecos dos queijos como por exemplo concentração de sal, pH, atividade de água, composição, microbiota presente e temperatura ambiente respectivamente (ROWE, 2014), e o tempo de sobrevivência depende de quanto cada fator esteja próximo do ótimo para a sobrevivência do agente. Por serem queijos de diferentes tipos de fabricação, é esperado que exista diferença no tempo de sobrevivência da bactéria entre os diferentes tipos de queijos estudados pelos autores, como observa-se na tabela 3.

Dentro os fatores citados anteriormente, foram encontrados dados relacionados a concentração de sal (NaCl), pH, atividade de água, porcentagem de gordura e temperatura ambiente somente. Não foram encontrados dados

relacionados a outros fatores intrínsecos como por exemplo potencial de oxido-redução, nem sobre a relação entre a microbiota antagônica existente nos queijos e a sobrevivência da *Brucella*.

ROWE (2014) e ICMSF (1996) destacaram que o aumento da concentração de sal possui efeito inibitório no crescimento da *Brucella*. Contudo o tempo de sobrevivência está também relacionado a temperatura de estocagem, podendo a *Brucella* sobreviver por longos períodos em concentrações altas de sal, porém estocadas a elevada temperatura (ICMSF, 1996).

De acordo com ICMSF, 1996, o tempo de sobrevivência da *Brucella* diminui à medida que o pH diminui. O limite inferior estaria por volta de 5.8 (ICMSF, 1996), porém, de acordo com o mesmo autor, outros fatores como o teor de gordura do produto e a umidade podem ter efeito protetivo sobre as células bacterianas reduzindo o efeito do pH isoladamente, permitindo a sobrevivência da bactéria em níveis de pH abaixo do limite inferior. A *Brucella* em geral sobrevive por períodos menores de tempo em queijos com baixa atividade de água, portanto queijos maturados, que possuem menor atividade de água são considerados mais seguros que queijos frescos (ROWE, 2014).

Quanto a temperatura, existe consenso entre os autores que quanto mais alta a temperatura de estocagem, menor o tempo de sobrevivência. ICMSF, 1996 cita o estudo de Kuzdas & Morse, 1954, no qual foi possível a sobrevivência da *Brucella* em leite por 800 dias em temperatura de -40°C, e por apenas 2 dias quando a 25°C. Vale ressaltar que o tempo de sobrevivência é resultado da interação dos fatores intrínsecos e extrínsecos do queijo e da carga inicial da bactéria.

A princípio pode-se observar que independentemente da população inicial no leite e da temperatura de cura, houve redução na contagem das bactérias durante a cura e a média de sobrevivência foi de menos de 30 dias. Deve-se levar em consideração que a tecnologia de produção de cada tipo de queijo atua de forma significativa nas características do produto final e por consequência no tempo de sobrevivência de agentes patogênicos como a *Brucella*. Esta informação está de acordo com os dados expostos na tabela 2, no qual o compilado de resultados apresentado pelas revisões de literatura encontradas

mostra justamente esta diferença entre os diversos tipos de queijos.

Como descrito anteriormente, valores de pH baixos exercem influência negativa sobre as bactérias reduzindo o tempo de sobrevivência (ICMSF, 1996). Nos queijos estudados, os valores de pH estiveram entre 4,5-6,0, variando entre cada queijo produzido. Estes valores estariam abaixo do limite mínimo de crescimento para a *Brucella* em produtos lácteos apontado por ICMSF, 1996.

Porém, de acordo com Santiago-Rodriguez (2015), a *Brucella* pode se adaptar as variações de pH observadas nos produtos lácteos devido a mecanismos osmoprotetivos e estudos como o de Kara & Akkaya (2014) demonstraram a sobrevivência de *Brucella* em pH inferior a 5,8.

No estudo de Santiago-Rodriguez 2015, foi observado que o tempo de sobrevivência das bactérias foi menor (17 dias) quando os valores de atividade de água eram mais baixos (0,895) e nos queijos curados a temperatura mais alta (24°C). Este achado está de acordo com a informação trazida por ICMSF, 1996. No estudo de Kara & Akkaya, 2014 também pode ser observada uma redução nos valores de atividade de água durante a cura, acompanhando a redução na contagem bacteriana. Na indústria de alimentos a redução da atividade de água é utilizada comumente para o controle de crescimento bacteriano (SANTIAGO-RODRIGUEZ, 2015).

5.2 Síntese Quantitativa, Meta-Análise

A partir dos modelos intra-estudo foi possível verificar que as variáveis mantiveram comportamento semelhante entre cada estudo. Em todos os estudos o tempo de cura determinou redução na contagem bacteriana, sendo que quanto maior o tempo de cura menor a população, e o tempo de sobrevivência médio das bactérias variou entre 20 e 30 dias.

Todos os modelos para tempo de cura apresentaram valores de R^2 elevados, acima de 0,7; com exceção do estudo de “Kara & Akkaya (1) Cru, 2015”, provavelmente devido a população inicial utilizada ser menor, que levou a uma redução mais rápida nos valores de concentração até zero, sendo utilizados no modelos apenas dois valores de contagem, para tempo 1 e tempo 7, diferentemente dos outros experimentos analisados que apresentavam maior quantidade de pontos para contagem bacteriana.

Quanto ao pH, observa-se que valores de pH mais altos estiveram associados a maior número de bactérias sobreviventes. Apesar disso, os modelos de regressão linear não foram totalmente adequados para todos os estudos, pois alguns queijos apresentaram redução na contagem bacteriana ao longo do tempo com valores de pH constantes, indicando que o pH nestas situações não teria efeito importante sobre a cinética de sobrevivência da *Brucella*, e portanto outros fatores como a atividade de água dos queijos ou a presença de microrganismos competidores teria maior influência sobre a redução na contagem bacteriana.

O comportamento da atividade de água foi semelhante entre os estudos, sendo que valores mais altos de atividade de água estiveram associados a contagem bacterianas mais altas. Os modelos foram mais adequados que os relacionados ao pH, pois a redução na atividade de água foi acompanhada por redução na contagem bacteriana.

A variável com menor valor de p , mais significativa, era colocada primeiro no cálculo modelo, por ter maior peso no resultado final. Para os queijos produzidos com leite cru, a ordem foi tempo de cura e atividade de água. Não foi possível incluir o pH neste cálculo porque alguns estudos apresentaram valores de pH constante, como já descrito anteriormente. No caso do leite pasteurizado, foi possível a inclusão das 3 variáveis, sendo o tempo de cura, seguido da atividade de água e do pH. Pelos valores de R^2 , as variáveis estudadas associadas explicaram acima de 80% do comportamento da população bacteriana (exceto Kara & Akkaya, 2015). Indicando que estes fatores associados podem ter influência sobre o controle da população bacteriana ao longo do tempo.

A meta-regressão foi realizada em seguida com o intuito de sintetizar os resultados encontrados, e produzir um modelo geral inter-estudo para explicar o comportamento da população bacteriana com base nos fatores observados pelos autores.

Nos modelos para cada variável isoladamente, não foram observadas diferenças significativas nos resultados para queijos produzidos com leite cru ou pasteurizado, exceto pela atividade de água no modelo para leite pasteurizado, que apresentou valor de R^2 negativo e baixa adequação do modelo. Esta

diferença pode ser explicada pelo fato de existirem menos dados de atividade de água nos produtos feitos com leite pasteurizado, por serem apenas 3 experimentos.

Os modelos resultantes foram mais adequados para o tempo de cura (R^2 0.67 e 0.68, leite cru e pasteurizado respectivamente) e para atividade de água (R^2 de 0.81, queijo de leite cru). Os modelos não foram adequados para o pH e para a temperatura, embora se saiba que ambos fatores influenciam na sobrevivência bacteriana (ICMSF, 1996).

Os modelos múltiplos foram significativos, para ambos os tipos de leite utilizados na fabricação dos queijos e apresentaram valores de R^2 acima de 0.80, ou seja, as variáveis tempo de cura, atividade de água, pH e temperatura associadas explicariam mais de 80% do comportamento da população bacteriana.

É provável que o baixo número de artigos experimentais envolvendo o comportamento de sobrevivência da *Brucella* em queijos curados contribuiu para que determinados modelos não se adequassem apesar da evidência presente na literatura sobre a influência de pH, atividade de água e temperatura no controle do crescimento bacteriano em alimentos. Um número maior de dados poderia favorecer a análise estatística adotada e elevaria a confiabilidade dos modelos. A dificuldade na execução de experimentos com *Brucella abortus* inoculada (agente de alto risco) pode ser uma explicação para o número pequeno de estudos encontrados.

A erradicação da brucelose em países desenvolvidos como Grã-Bretanha, Áustria, Dinamarca, Alemanha e Holanda, justifica o menor interesse da comunidade científica por estudos dessa natureza, contribuindo para a escassez de dados. Porém ainda são registrados casos de brucelose humana em países do sul da Europa, como Grécia, Portugal e Espanha, bem como em populações específicas como imigrantes Turcos na Alemanha (DEAN et al., 2012)

No caso dos Estados Unidos, que apresenta estados com erradicação da doença, ainda são registrados casos relacionados ao consumo de produtos, principalmente lácteos, por populações de origem hispânica (DEAN et al., 2012; PAPPAS, 2006). Sendo assim, a brucelose ainda se configura como um

problema de saúde pública, principalmente relacionado a populações de baixa renda (DEAN et al., 2012), ressaltando-se a importância da realização de mais estudos sobre o tema.

Apesar do reduzido número de dados levantados, os modelos construídos podem servir de base para a construção de modelos mais elaborados futuramente e que possam ser validados e utilizados para o monitoramento e predição do crescimento de *Brucella abortus* em queijos.

Vale ressaltar também a importância da realização de estudos sobre a influência de outros fatores sobre a cinética de sobrevivência da *Brucella*, como por exemplo concentração de sal e umidade além dos microrganismos competidores como as bactérias ácido lácticas (BAL), que podem reduzir a concentração de bactérias patogênicas e deteriorantes, pela competição por nutrientes, pela ação de metabólitos produzidos e pela ação de bacteriocinas, peptídeos sintetizados pelas BAL (JAY, 2005).

6.0 Conclusão

A sintetização dos dados presentes na literatura sobre fatores associados a contaminação de queijos por *Brucella abortus*, bem como sobre a cinética de sobrevivência destas bactérias durante a cura de diferentes tipos de queijos demonstrou que ainda existe falta de informação sobre o tema e que são necessários mais estudos experimentais que avaliem a sobrevivência desta bactéria em produtos lácteos.

A partir destes resultados pode-se afirmar que o consumo de produtos lácteos informais, ainda presente no Brasil, deve ser desestimulado porque representa um risco à saúde pública.

Ressalta-se que a realização de estudos de análise de risco baseados nos dados identificados na literatura e a construção de modelos de predição do crescimento de *Brucella abortus* em queijos devem ser utilizados como ferramentas para o controle desta enfermidade de transmissão alimentar, favorecendo assim a comercialização de produtos seguros para a população.

7.0 Referências

ANZAI, E.K., COSTA, D., SAID, A.L.P.R., GRISI-FILHO, J.H.H., AMAKU, M., DIAS, R.A., FERREIRA, F., GALVIS, J.O.A., GONÇALVES, V.S.P., HEINEMANN, M.B., TELLES, E.O., FERREIRA NETO, J.S. An update on the epidemiologic situation of bovine brucellosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3437-3448, 2016.

AZEVEDO, S.S.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; SOUZA, A.C.; VASCONCELLOS, S.A. Situação epidemiológica da brucelose no estado do Espírito Santo. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.19-26, nov.2009.

BAUMGARTEN, K.D., VELOSO, F.P., GRISI-FILHO, J.H.H., FERREIRA, F., AMAKU, M., DIAS, R.A., TELLES, E.O., HEINEMANN, M.B., GONÇALVES, V.S.P., FERREIRA NETO, J.S. Prevalence and risk factors for bovine brucellosis in the state of Santa Catarina, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3425-3436, 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL –Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Portaria Nº 146 de 07 de Março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 11 mar 1996. Seção I, pt. 3977.

BRASIL. Decreto Nº 66.183, de 5 de fevereiro de 1970. Regulamenta o Decreto-lei n.923, de 10 de outubro de 1969, que dispõe sobre a comercialização de leite cru. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 5 fev 1970.

CHIRIFE, J.; BUERA, M. D. Water Activity, Water Glass Dynamics, and the Control of Microbiological Growth in Foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 36, n. 5, p. 465–513, maio 1996.

DEAN, A. S.; CRUMP, L.; GRETER, H.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1865, 2012.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.70,

n.1, p 25-33, 2003.

DIAZ CINCO ME, ACEDO F, EVELIA LD, ALMA B. Survival of *Brucella abortus* in the Mexican white cheese processing. **Recent Research Developments in Nutrition Research**, v.2, p 47-57, 1998.

DIAS, J.A.; MÜLLER, E.E.; DIAS, R.A.; FREITAS, J.C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, M.C.P.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.66-76, nov.2009.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.118-125, nov.2009.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Indicadores: Leite e Derivados. Juiz de Fora - ano 9, n.76, 2018.

FERREIRA-NETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. **Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3385-3402, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CDC. **Bad Bug Book**, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [Pathogenic Bacteria, Gram negative], p.33-37, 2012.

GILMAN, H.L.; DAHLBERG, A.C.; MARQUARDT, J.C. The occurrence and survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburguer cheese. **Journal of Dairy Science**, v.29, n. 2, p. 71-85, 1946.

HASANJANI, R. M. R; EBRAHIMPOUR, S. Human brucellosis: An overview. **Caspian Journal of Internal Medicine**. Babol, v. 6, n.1, p.46-47, jan.2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF). Ano 2013.

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria IMA nº 1736 de 27 de julho de 2017**. Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=346814> . Acesso em: 04 mai 2018.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in Foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens**. 1.ed. London. Springer, 1996, p.36-44.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7.ed. London. Springer, 2005, p. 545-566.

KÄSTLI, P., HAUSCH, R. Die Lebensfähigkeit von Bangbakterien in verschiedenen Käsesorten. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v.99, p.638-644, 1957.

KARA. R.; AKKAYA, L. Behavior of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in afyon tulum cheese. **Journal of Food Safety**, v. 35, p.13–18, 2015.

KLEIN-GUNNEWIEK, M.F.C.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; GITTI, C.B.; PEREIRA, L.A.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; Ferreira Neto J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, p.77-84, nov.2009.

KUZDAS, C.D.; MORSE, E.V. The survival of *Brucella abortus*, USDA strain 2308, under controlled conditions in nature. **Cornell veterinarian**. Nova Iorque. v.44, p.216-18, abr.1954.

LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; PAIXÃO, T.A.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K.L.; ALVES, C.M.; MOL, J.P.S.; SANTOS, R.L. Brucelose bovina uma atualização. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.32, n.3, p.202-212, jul/set.2008.

LERCHE, M., LORENZEN. Erfahrungen in der Amtlichen Milchkontrolle von Vorzugs und Markenmilch. **Milchwirtschaftliche Forschung, Orig.** v.13, p. 457-507, 1932.

MCQUESTIN, O.J.; SHADBOLT, C.T.; ROSS, T. Quantification of the relative effects of temperature, pH, and Water activity on inactivation of *Escherichia coli* in fermented meat by meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.75, n. 22, p.6963-6972, nov.2009.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n. 1436, 26 de setembro de 2014**. Dispõe sobre a inclusão de estabelecimentos de produtos de origem animal no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, MG, 2014.

MYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. Dissertação

(Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004, 75p.

OLIVEIRA, L.F., DORNELES, E.M.S., MOTA, A.L.A.A., GOLÇALVES, V.S.P., FERREIRA NETO, J.S., FERREIRA, F., DIAS, R.A., TELLES, E.O., GRISI-FILHO, J.H.H., HEINEMANN, M.B., AMAKU, M., LAGE, A.P. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Minas Gerais State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3449-3466, 2016.

OIE - World organisation for animal health- **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2016.

OMS - Organização mundial de saúde. **Doença: brucelose**, 2001.

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Perspectivas sobre a análise de risco na segurança dos alimentos**. Curso de sensibilização. Rio de Janeiro. OPAS/OMS, 160p, 2008.

PAULA, C.L.; MIONI, M.S.R.; APPOLINÁRIO, C.M.; KATAYAMA, E.R.; ALLENDORF, S.D.; MEGID, J. Detecção de *Brucella spp* em leite bovino não pasteurizado através na reação em cadeia da polimerase (PCR). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82 1-5, 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** v.2, p.115–120, 1988.

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

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, Lisboa, v.10, n. 2, 2003.

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

RAMMEL, C.G. *Brucella* in dairy products: a review. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.22, p.40-3, 1967.

ROWE, M.T. Problems with dairy products. In: BATT, C.A.; TORTORELLO, M.L. **Encyclopedia of food microbiology**. 2 ed. Oxford. Elsevier, 2014, p. 340-343.

RYSER, E.T. Public Health Concerns. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2 ed. Nova Iorque. 2001, p.397-594.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, M.R.; APARICIO, E.D.; REYNOSO, B.A.; GARCÍA-LOBO, J.M.; GIMENO, M.; PALOMARES-RESENDIZ, E.G.; HERNANDEZ-CASTRO, R. Survival of *Brucella abortus* aqpx mutant in fresh and ripened cheeses. **Foodborne pathogens and disease**, v.12. n.2, 2015.

SILVA, N.S., GROFF, A.C.M., VIDOR, A.C.M., GRISI-FILHO, J.H.H., HEINEMANN, M.B., DIAS, R.A., TELLES, E.O., GONÇALVES, V.S.P., AMAKU, M.A., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J.S. Epidemiological situation of bovine brucellosis after implementation of a vaccination program in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, supl. 2, p. 3519-3530, 2016.

SOLA, M.C.; FREITAS, F.A.; SENA, E.L.S.; MESQUITA, A.J. Brucelose bovina: revisão. **Enciclopédia biosfera**, v.10, n.18, p.710, 2014.

THERON, J.; THANTSHA, M.S. *Brucella*. In: BATT, C.A.; TORTORELLO, M.L. **Encyclopedia of food microbiology**. 2.ed. Oxford. Elsevier, 2014, p. 335-339.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; BURGER, K.P.; GONCALVES, A.C.S.; GRISOLIO, A.P.R.; AGUILAR, C.E.G.; ROSSI, G.A.M. Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre seus agravos à saúde pública, em um município do estado de São Paulo, Brasil. **B. Indústria animal.**, Nova Odessa, v.70, n.3, p.221-227, 2013.