UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

KARINA RAMIREZ STARIKOFF

# **Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo**: definição de protocolo de estudo

São Paulo
2011

KARINA RAMIREZ STARIKOFF

versão corrigida

# Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo: definição de protocolo de estudo

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
032006

De acordo.
Evelise O. Telles
Orientadora

São Paulo
2011

**OBS. a versão original se encontra 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 Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2511
FMVZ

Starikoff, Karina Ramirez
Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo: definição de protocolo de estudo / Karina Ramirez Starikoff.-- 2011.
63 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Queijo tipo Parmesão. 2. Cura. 3. Valor D 18 °C. 4. *Mycobacterium bovis*. 5. Espoligotipo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Sobrevivência do *Mycobacterium bovis* em queijo parmesão", protocolado sob o nº1379/2008, utilizando amostras de queijo, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Survival of *Mycobacterium bovis* in parmigiano cheese", protocol number 1379/2008, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: STARIKOFF, Karina Ramirez

Título: Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo: definição de protocolo de estudo

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____

# DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais:* ***Nadejda Starikoff Pashkoff*** *e* ***Francisco Javier Ramirez Fernandez*** *por estarem sempre ao meu lado, pela imprescindível ajuda na conclusão de todas as fases da minha vida, por todo apoio, incentivo e amor incondicional.*

*Ao meu lindo marido:* ***Adriano Di Nizo*** *muito obrigada por estar sempre ao meu lado, pela cumplicidade, pelo amor, pela paciência e pelo incentivo;*

*Aos meus irmãos:* ***Nadejda Ramirez Starikoff*** *e* ***Francisco Javier Ramirez Starikoff*** *que são uma fonte de inspiração nas suas vitórias individuais, obrigada pelo carinho e amizade, e por compartilhar as minhas conquistas;*

*A minha tia:* ***Raisa Starikoff Pashkoff*** *pelas inúmeras conversas, aos desabafos, por todo o apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida;*

*A toda minha família e amigos, por todos os momentos agradáveis e pela amizade;*

*A* ***Profa. Evelise Oliveira Telles*** *que sempre esteve disponível e ajudou em todas as etapas deste trabalho, obrigada pela orientação e confiança, por passar toda sua experiência e sabedoria, obrigada por sua amizade.*

# AGRADECIMENTOS

*Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira** pela contribuição estatística nas análises realizadas.*

*As funcionárias do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, **Zenaide** e **Gisele**, por toda contribuição à realização deste trabalho, pelos ensinamentos, empréstimos de material e principalmente pela paciência e amizade.*

*Aos funcionários do Laboratório de Higiene Alimentar, **Orlando Bispo de Souza** e **Sandra Abelardo Sanches** pela ajuda essencial na realização de todo experimento, pela disponibilidade, paciência, dedicação e amizade, e porque sem vocês eu acho que seria impossível a conclusão desta pesquisa.*

*Aos pós-graduandos e alunos da FMVZ, pela contribuição na realização do projeto, e em especial: **Camila Nóia, Camila Fontanesi, Fernanda Maciel** (Valeu pela força, pelos momentos e por todas as conversas).*

*A todos os pós-graduandos, professores e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Animal que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*A Capes Demanda Social pela concessão da bolsa de doutorado.*

**"Não escolhemos a forma do nosso destino,**
**mas podemos dotá-lo de conteúdo."**
Dag Hammarskjöld

## RESUMO

STARIKOFF, K. R. **Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo:** definição de protocolo de estudo. [Inactivation of *Mycobacterium bovis* during the curing of cheese: study protocol definition]. 2011. 63 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A legislação permite o uso de leite cru para fabricar queijos com maturação superior a 60 dias em temperatura acima de 5°C, mas falta comprovação científica sólida sobre a eficácia desse processo quanto à inativação de importantes patógenos que podem estar presentes no leite, como o *Mycobacterium bovis*; além disso, não há metodologia oficial para pesquisa deste agente em alimentos. Desta forma, este trabalho se propôs a estabelecer um protocolo para estudar a curva de inativação do *Mycobacterium bovis* durante a cura do queijo. Foram fabricadas três partidas de queijo do tipo parmesão com leite pasteurizado e contaminado com uma cepa de *Mycobacterium bovis* isolada de bovinos abatidos no estado de São Paulo. O queijo foi curado a 18°C e analisado semanalmente até o 63ºdia. As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada, semeadas em duplicata em meio Stonebrink-Leslie, acrescido de antibióticos, e incubadas a 37°C por 45 dias. Os resultados de um queijo foram perdidos por contaminação por fungos. O valor $D_{18°C}$ médio, ponderado pelas incertezas, foi de 37,5 dias ± 5,3 dias. Esse resultado indica a necessidade de outros estudos para ampliar o número de queijos estudados e obter, portanto, um resultado mais representativo do efeito da cura sobre o decaimento da população de *M. bovis*. Há também necessidade de melhorar o poder inibitório do meio de cultura para evitar perdas devido ao crescimento de fungos.



Palavras-chave: Queijo tipo Parmesão. Cura. Valor $D_{18°C.}$ *Mycobacterium bovis*. Espoligotipo.

## ABSTRACT

STARIKOFF, K. R. **Inactivation of *Mycobacterium bovis* during the curing of cheese:** study protocol definition. [Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo: definição de protocolo de estudo]. 2011. 63 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The legislation that regulates the specific conditions for the consumption of food allows the use of raw milk to produce cheese matured over 60 days at temperatures above 5°C; however, the effectiveness of this process in the inactivation of important pathogens that may be present in milk, such as *Mycobacterium bovis*, lacks solid scientific evidence. In addition, there is no official methodology for the research of this pathogen in foods. Considering that context, this study proposes to establish a protocol to study the inactivation curve of *Mycobacterium bovis* during cheese curing. Three matches were made with parmesan cheese and pasteurized milk contaminated with a strain of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered in the state of São Paulo. The cheese was cured at 18°C and analyzed weekly until the 63th day. The samples were submitted to decimal serial dilution, plated in duplicate in the Middle Stonebrink-Leslie, plus antibiotics, and incubated at 37° C for 45 days. The results of a single cheese were lost to fungal contamination. The value D 18°C average, weighted by the uncertainties, was 37.5 days ±5.3 days. This result indicates the need for further studies to expand the number of cheeses studied and to therefore obtain a more representative result of the effect of healing on the decay of the population of *M. bovis*. There is also the need to improve the inhibiting power of the culture medium to avoid losses due to fungal growth.



Key words: Parmesan cheese. Maturation. Value $D_{18°C}$. *Mycobacterium bovis*. Spoligotyping.

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Produção total de leite sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000 - 2008..... 21

Quadro 2 – Resultados em log das contagens de UFC/mL ou log UFC/g de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) no leite contaminado, na coalhada e no queijo durante a maturação do queijo tipo parmesão..... 60

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Produção Brasileira de Leite..... 21

Gráfico 2 – Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB 1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo 1 durante o período de maturação a 18°C. ..... 42

Gráfico 3 – Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB 1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo 3 durante o período de maturação a 18°C. ..... 42

Gráfico 4 – Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo durante o período de maturação a 20°C, e sua regressão linear. ..... 60

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de Gráfico semi-logarítmico para o cálculo do Valor D..... 26

Figura 2 – Preparação do Inóculo de *Mycobacterium bovis* ..... 32

Figura 3 – Fabricação do Queijo tipo Parmesão (etapa 1) ..... 35

Figura 4 – Fabricação do Queijo tipo Parmesão (etapa 2) ..... 36

Figura 5 – Análise Quantitativa..... 38

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das contagens (log UFC/g) de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) no leite e no queijo tipo parmesão durante a cura a 18°C ..... 41

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AIDS | Síndrome de Imunodeficiência Adquirida |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EPAMIG | Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais |
| EPI | Equipamento de Proteção Individual |
| FMVZ | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia |
| g | Grama |
| hs | Horas |
| kg | Quiilograma |
| log | Logaritmo |
| *L. monocitogenes* | *Listeria monocitogenes* |
| min | Minuto |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| *M. avium* | *Mycobacterium avium* |
| *M. bovis* | *Mycobacterium bovis* |
| *M. fortuitum* | *Mycobacterium fortuitum* |
| *M. gordonae* | *Mycobacterium gordonae* |
| *M. kansaii* | *Mycobacterium kansaii* |
| *M. marinum* | *Mycobacterium marinum* |
| *M. paratuberculosis* | *Mycobacterium avium paratuberculosis* |
| PNCEBT | Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose |

| | |
|---|---|
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal |
| seg | Segundos |
| U | Unidade |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |
| UHT | Ultra High Temperature |
| USP | Universidade de São Paulo |
| v/v | Volume por volume |

# LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| °C | Graus Celcius |
| < | Menor |
| % | Porcentagem |

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO** ..... 19

**2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... 21

**3 MATERIAL E MÉTODOS** ..... 30

3.1 LEITE ..... 30

3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO ..... 30

3.3 MEIO DE CULTURA ..... 33

3.4 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO ..... 33

3.5 COLETA E ANÁLISE QUANTITATIVA ..... 37

3.6 CONTAGEM DE COLÔNIAS E REGISTRO DE RESULTADOS ..... 39

3.7 MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA ..... 39

**4 RESULTADOS e DISCUSSÃO** ..... 41

**5 CONCLUSÂO** ..... 47

**REFERÊNCIAS** ..... 48

**APÊNDICES** ..... 54

# 1 INTRODUÇÃO

O leite destinado ao consumo em forma fluída, bem como para a produção de derivados comestíveis, deve ser propriamente pasteurizado segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952). Exceção é feita aos queijos com maturação acima de 60 dias, segundo a normativa federal (BRASIL, 1996).

Ocorre que a cinética de morte de patógenos devido à cura de queijos não está bem estabelecida. Além disso, é provável que a taxa de morte esteja relacionada ao tipo de queijo em questão, considerando a microbiota específica, o processo de fabricação e as condições da cura (tempo, temperatura e umidade).

Não obstante existam relatos de valores D em queijo para o *Mycobacterium paratuberculosis*, variando de 27,8 a 59,9 dias em queijos maturados (SUNG; COLLINS, 2000; SPAHR; SCHAFROTH, 2001) e de 90 a 107 dias em queijo tipo cheddar (DONAGHY; TOTTON; ROWE, 2004), na literatura não foram encontrados dados sobre a inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura. O valor D indica o tempo necessário para reduzir um ciclo logarítmico do agente, a uma dada temperatura (JAY, 2000a).

Esses fatos ganham mais importância em função aos recentes movimentos que propõem a redução dos 60 dias de maturação obrigatória pela legislação federal. Segundo Amado (2010), o Governo de Minas Gerais solicitou uma revisão desse prazo mínimo para que o queijo artesanal mineiro, que tem cura de 21 dias, pudesse ser enquadrado na legislação federal e, portanto, pudesse ser comercializado além das fronteiras do estado.

A partir de 2001 houve uma melhor organização de combate à tuberculose bovina no Brasil, quando foi instituído o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), fazendo crescer o interesse do meio científico por essa zoonose e, em decorrência, começaram a ser organizadas coleções de isolados. Assim o momento é oportuno para a

realização de estudos que avaliem o comportamento dessas cepas que circulam no nosso território, frente aos processos de fabricação de queijos.

De acordo com os fatos apresentados, esta pesquisa teve como objetivos:

- ✓ Estabelecer um protocolo de estudo sobre o decaimento da população de *Mycobacterium bovis* durante a cura do queijo tipo parmesão,
- ✓ Avaliar a hipótese de que a cura por 60 dias não confira a necessária segurança ao produto, no que se refere ao *Mycobacterium bovis*.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo dados divulgados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), nem todo leite produzido no país é controlado pelos serviços oficiais de inspeção, como pode ser observado no quadro 1 e gráfico 1. Aproximadamente 40% do leite produzido são consumidos pelo mercado informal, sem qualquer fiscalização higiênico-sanitária.

| Ano | Produção total de leite (milhões de litros) | Produção recebida sob inspeção (milhões de litros) | vacas ordenhadas (mil cabeças) |
|---|---|---|---|
| 2000 | 19.767 | 12.108 | 17.885 |
| 2001 | 20.510 | 13.213 | 18.194 |
| 2002 | 21.643 | 13.221 | 18.793 |
| 2003 | 22.254 | 13.627 | 19.256 |
| 2004 | 23.475 | 14.495 | 20.023 |
| 2005 | 24.621 | 16.284 | 20.626 |
| 2006 | 25.398 | 16.670 | 20.943 |
| 2007 | 26.134 | 17.889 | 21.122 |
| 2008 | 27.083 | 19.095 | 21.503 |

Quadro 1 - Produção total de leite sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000 - 2008

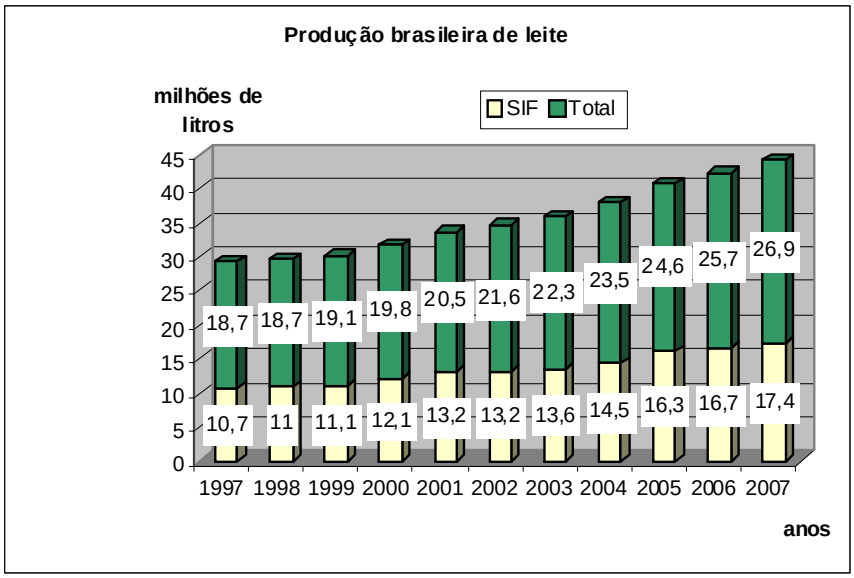


Gráfico 1 - Produção Brasileira de Leite

Já o queijo produzido no Brasil tem grande parte de sua fabricação ainda feita de maneira artesanal e sem controle higiênico-sanitário ou de qualidade (BORTOLETO; CROCETTA, 1997), o que corresponde a cerca de 50% da quantidade total produzida.

Segundo o RIISPOA (BRASIL, 1952), a pasteurização consiste no aquecimento do leite para eliminar os microrganismos patogênicos que, eventualmente, estejam presentes e reduzir a microbiota deteriorante, alterando o mínimo possível os autóctones que o leite possui. Os binômios de tempo e temperatura aprovados para o leite são: 62 a 65°C por 30 minutos (pasteurização lenta) ou 72 a 75°C por 20 segundos (pasteurização rápida).

Os parâmetros de tempo e temperatura de pasteurização do leite do RIISPOA basearam-se na resistência térmica do *Mycobacterium* spp e da *Coxiella burnetti*. O primeiro padrão de pasteurização foi estabelecido em 1924, e indicava que o aquecimento a 61,1°C por 30 minutos eliminava o *M. tuberculosis* (NORTH; PARK, 1927), porém, mais tarde verificou-se que a *Coxiella burnetti* sobrevivia à 61,7°C/30 minutos (HUEBNER et al., 1949); tal fato determinou a revisão dos protocolos estabelecidos promovendo o aumento da temperatura para 62,8°C/30minutos como padrão oficial nos Estados Unidos (STABEL, 2003).

As taxas de morbidade e mortalidade da tuberculose aumentaram significativamente nas últimas décadas segundo a emergência de cepas de diversas espécies de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas, acompanhando, em particular, o surto da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) – epidêmica (KONEMAN et al., 2001).

A observação de Pivetta (2004) de que o Brasil é o único país das Américas a figurar na lista das 22 nações que concentram 80% das ocorrências de tuberculose humana no mundo, associada às afirmações de Kleeberg (1984), de que o homem é tão sensível ao bacilo bovino (*Mycobacterium bovis*) quanto ao bacilo humano (*Mycobacterium tuberculosis)*, permitem ressaltar a importância de projetos integrados em saúde animal, industrialização dos produtos e saúde pública para redução da incidência da doença.

O *Mycobacterium bovis*, juntamente com o *Mycobacterium tuberculosis* e com o *Mycobacterium africanum*, formam o “Complexo *M. tuberculosis*”, sendo todos sempre patogênicos aos seres humanos. O *M.bovis* causa, em humanos,

tuberculose semelhante àquela causada pelo *M. tuberculosis* (TERRUGI, 2000).

A tuberculose bovina é uma enfermidade crônica infecto-contagiosa de caráter granulomatoso, acometendo especialmente o sistema respiratório dos hospedeiros infectados. O fato de esta doença afetar diversas espécies além dos bovinos a transforma em importante problema, por provocar prejuízos à pecuária bovina, além do risco à saúde pública frente ao seu aspecto zoonótico.

Segundo Cousins, Williams e Dawson (1999) a proporção dos casos de tuberculose causados pelo *M. bovis* é de 1,5%. Dentre os 80.000 casos de tuberculose humana registrados anualmente no Brasil acredita-se que quatro mil sejam transmitidos pelo leite (SOUZA, 1999).

Em estudo realizado para determinar a secreção de *Mycobacterium* spp. pelo leite de bovinos em gado criado no Planalto Sul da Tanzânia, sociedade onde o leite é normalmente consumido cru, de 805 amostras de leite, 31 (3,9%) foram positivas para micobactérias. Houve predomínio de micobactérias atípicas (87%) enquanto que apenas dois isolados (6,5%) foram confirmados como *M. bovis* (KAZWALA et al.,1998).

Em outro estudo um total de 780 amostras de leite de 52 animais, positivos ou suspeitos para tuberculose pelo teste Stormont, porém sem apresentar alterações clínicas, foram analisadas para detectar *Mycobacterium* spp. Foram coletados 300 ml por vaca na primeira ordenha do dia, durante 15 dias. O isolamento de *Mycobacterium* spp. foi confirmado em 78 (10%) amostras coletadas de 19 (36,54%) animais. De acordo com a cromatografia em camada delgada, as características de tempo e temperatura de crescimento e aspectos das colônias, os 19 animais eliminaram: *M. avium* (5,26%), *M. fortuitum* (10,52%), *M. bovis* (5,26%) e *Mycobacterium* spp. (78,95%) (PARDO et al., 2001).

Na Europa, o *M. bovis* já foi isolado de manteiga, creme, queijo fresco e queijo integral curado; foi verificada a sobrevivência de *M. bovis* em manteiga à

temperatura ambiente por 32 dias; manteiga salgada conservada a 4°C por 151 dias e em pequeno número até 180 dias; em queijos gordos até um ano. O número e a virulência dos bacilos se mantiveram inalterados (CORREA; CORREA, 1983).

Por essas razões tem aumentado as investigações epidemiológicas sobre a qualidade higiênico-sanitárias dos alimentos e alguns trabalhos têm focado particularmente o queijo e a presença de contaminação por *Mycobacterium bovis*.

Em pesquisa desenvolvida com produtos lácteos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo foi possível verificar, por diagnóstico molecular, que o DNA do *Mycobacterium bovis* estava presente em 22,7% das amostras de queijo, de 76 amostras analisadas (VIALTA et al., 2003).

Pesquisas destacam uma elevada incidência de tuberculose humana por *Mycobacterium bovis* em certas regiões dos Estados Unidos. Besser et al. (2001), divulga que em San Diego um terço de todos casos infantis de tuberculose são por *Mycobacterium bovis*, cepa associada com produtos lácteos produzidos com leite cru.

Dankner e Davis, (2000), relata que a incidência anual de tuberculose nos Estados Unidos começou a aumentar em 1989 e teve um pico em meados de 1990; o *M bovis* causou 10,8% de todos os casos de tuberculose neste período. Em San Diego, outro estudo diagnosticou que entre 1994 e 2000, de 1931 casos de tuberculose com cultura positiva, 129 (6,7%) foram causados por *Mycobacterium bovis* (LOBUE et al., 2003).

Uma investigação epidemiológica similar em Nova Iorque reportou que 1% dos casos de tuberculose com cultura positiva nesta área também foi por *Mycobacterium bovis.* Os resultados preliminares indicaram que o queijo fresco vindo do México foi uma provável fonte de infecção, pois não foi observada nenhuma evidência de transmissão direta entre indivíduos. Desde 2001 instalou-se como rotina a espoligotipagem do complexo *M. tuberculosis* isolados de pacientes com diagnóstico de tuberculose. De 4.524 casos de

tuberculose reportados durante 2001-2004, um total de 76% (3.417casos) foi confirmado por cultura. E 91% (3.123) desses casos têm resultado de espoligotipo, dos quais 35 (1%) foram de *M. bovis*. (WINTERS et al., 2005).

Amostras de queijo (incluindo um tipo duro, tipo semi-duro e muitos tipos de queijos moles) foram coletadas de viajantes que entraram nos EUA pelo porto de San Ysidro, Califórnia. Das 203 amostras analisadas, 10 amostras (4,9%) foram positivas para o gênero *Mycobacterium* e uma identificada como *Mycobacterium bovis* (HARRIS et al., 2007).

Em função desses dados a Food and Drug Administration (FDA) publicou uma advertência em 2005, quanto ao consumo de produtos feitos com leite não pasteurizado e que representam um risco para a saúde, especialmente para os grupos de alto risco, tais como as mulheres grávidas, recém-nascidos, os idosos e as pessoas com o sistema imunológico enfraquecido: ultimamente, têm sido relacionados casos de tuberculose na cidade de Nova York com o consumo de queijos frescos trazidos do México contaminados com *Mycobacterium bovis* (FDA, 2005).

Kinde et al. (2007) relata que a FDA exige a prévia pasteurização do leite para todos os derivados lácteos, exceto para os queijos que têm, no mínimo, 60 dias de maturação.

Os trabalhos realizados após 1960 sobre a resistência térmica do *Mycobacterium* spp são escassos, exceção é feita ao *M. paratuberculosis* que, a partir da década de 90 foi intensamente estudado, devido a potencial relação com a doença de Crohn e ao fato de poder estar presente no leite cru. Algumas pesquisas foram realizadas para assegurar que a pasteurização conferia inativação aceitável com adequada margem de segurança (GRANT; BALL; ROWE, 1996; SUNG; COLLINS, 1998; STABEL, 2001).

Com o intuito de compreender e caracterizar melhor as condições que permitem a destruição térmica dos microrganismos convenciona-se apresentar os resultados em torno do valor “D”, que é o tempo necessário para reduzir o

número de microrganismos a um décimo do seu valor inicial, a uma temperatura específica (JAY, 2000a).

A população de microrganismos em um determinado ambiente submetido a um estresse térmico apresenta um decaimento exponencial em relação ao tempo dessa exposição. Para usufruir desse comportamento, normalmente se representa a variação da população em um gráfico semi-logarítmico, onde na ordenada se registra o número de microrganismos sobreviventes e na abscissa o tempo de tratamento térmico. No gráfico resultante se identifica a distribuição de valores que apresentem o maior coeficiente de correlação com uma reta para selecionar a redução de um ciclo logarítmico dos microrganismos sobreviventes (em log), e projetando-os ao eixo referente ao tempo, encontra-se o valor D (Figura 1); esse valor numérico é de alta relevância para a análise de risco, possibilitando calcular o nível de segurança conferido ao produto submetido a um processamento térmico (JAY, 2000a).

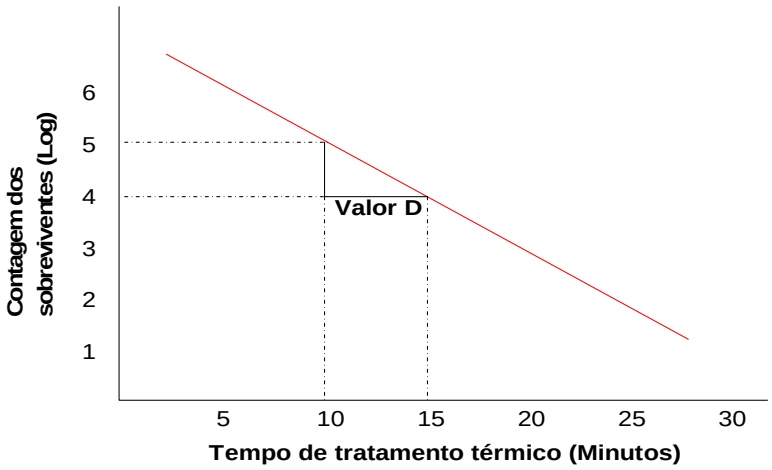


Figura 1 – Modelo de Gráfico semi-logarítmico para o cálculo do Valor D

Alguns estudos têm utilizado esta ferramenta para investigar o comportamento das micobactérias no leite e também em outros substratos (SUNG; COLLINS, 1998; SPAHR; SCHAFROTH, 2001; DONAGHY; TOTTON; ROWE, 2004). Porém estudos com o *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijos são limitados e antigos (KASTLI; BINZ, 1949 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p.

4200; HAMMER; BABEL, 1957 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; HAHN, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; IOTOV; TODOROV, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; LAFONT; LAFONT, 1981 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200), diferente do encontrado para outros microrganismos patogênicos, como por exemplo, a *Listeria monocytogenes* (RYSER; MARTH, 1987; YOUSEF; MARTH, 1988; YOUSEF; MARTH, 1990; LOPEZ; SANCHEZ, 2000; ERKMEN, 2000).

López e Sánchez (2000) fabricaram dois queijos mexicanos (Manchego e Chihuahua) contaminados com $10^6$ UFC/ml de *L. monocytogenes* e verificaram a sobrevivência do microrganismo até o fim da maturação realizada a 12°C, no queijo Manchego por cinco dias e com pequena redução no queijo Chihuahua após a cura por 6 semanas. Erkmen (2000) verificou a sobrevivência do mesmo agente por mais que 90 dias de maturação em queijo branco tipo turco feito com e sem cultura “starter”, maturado a 4°C. Ryser e Marth (1987) observaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em queijo cheddar por mais que um ano, e Yousef e Marth (1988) em queijo Colby por mais que 14 dias. Porém em estudo em queijo do tipo parmesão, fabricados com leite contaminado com $10^4$ a $10^5$ UFC/ml de *L. monocytogenes*, Yousef e Marth (1990) acompanharam a maturação por 16 semanas e não detectaram células nos queijos após 2 semanas.

Presume-se que exista aumento da resistência térmica dos microrganismos em produtos com elevado teor de gordura, devido ao fato de afetar o conteúdo de água da célula (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Mudanças nas características do substrato, bem como na microbiota competitiva, podem influenciar a sobrevivência de um microrganismo (JAY, 2000b).

Sung e Collins (2000) registraram valor $D_{4°C}$ de 59,9 dias em estudo sobre a curva de sobreviventes do *M. paratuberculosis* em queijo branco macio - Queso Fresco, o que reforça a necessidade de estudos que avaliem do tempo de maturação mínimo necessário para se produzir queijos seguros a partir de leite cru.

Spahr e Schafroth (2001) desenvolveram uma pesquisa onde leite cru foi artificialmente contaminado com células de *M. avium paratuberculosis* numa concentração alta de $10^4$ – $10^5$ UFC/mL e usado para fabricar um modelo de queijo duro e outro semi-duro. A sobrevivência do microrganismo foi avaliada durante os 120 dias de maturação. Células viáveis foram detectadas até o 120° dia. O valor D foi de 27,8 dias para o queijo duro, é necessário ressaltar que a maturação foi realizada com um ciclo térmico, conforme as seguintes taxas de variação: 10 dias a 12°C seguido de 60 dias a 22°C e finalizado com 50 dias a 12°C. O valor D para o queijo semiduro foi de 45,5 dias, mas a maturação foi realizada em temperatura de 15°C por 120 dias.

Outra pesquisa feita com queijos tipo cheddar, preparados com leite pasteurizado contaminado com três diferentes cepas de *M. paratuberculosis* em concentração alta ($10^4$ – $10^5$ UFC/mL) e baixa ($10^1$ - $10^2$ UFC/mL), obteve como resultado valor D para as diferentes cepas de: 107, 96 e 90 dias. A sobrevivência do microrganismo foi monitorada por 27 semanas a 10°C. (DONAGHY; TOTTON; ROWE, 2004).

Em estudo mais recente, Nishimoto (2006) avaliou o valor $D_{65ºC}$ do *M. fortuitum* (NCTN 8573) em leite integral e desnatado, e concluiu que para o leite desnatado o valor D foi de 7,82 minutos e no leite integral foi de 18,02 minutos. Observou também, que a pasteurização não reduziu o nível de contaminação a níveis não detectáveis (<10 UFC/mL), ao contrário dos achados de Grant, Ball e Rowe (1998) que não observaram nenhum *M. bovis* ou *M. fortuitum* sobrevivendo a 63°C/30 minutos, empregando uma contaminação inicial similar ($10^7$ UFC/mL).

Starikoff (2006) fez um estudo similar ao de Nishimoto (2006), mas empregando leite de cabra como substrato e também não registrou desvitalização total do inóculo; encontrou valores D para 65°C de 10,51 minutos no leite integral e 8,61 minutos no desnatado.

Leite et al. (2003) analisaram 78 amostras de leite cru e 40 de pasteurizado e obtiveram 14 amostras positivas em leite cru (16,7%), sendo 1 *M. bovis*, 4 *M. fortuitum*, 1 *M. marinum*, 5 *M. gordonae*, e 3 não identificadas de crescimento

rápido; 9 amostras foram positivas em leite pasteurizado (22,5%), sendo 2 *M. fortuitum*, 2 *M. marinum*, 1 *M. kansaii*, 1 *M. gordonae*, e 3 não identificadas de crescimento rápido. Esses resultados sugerem a possibilidade de existência de estirpes de *M. bovis* resistentes à pasteurização, ou ainda, subtratamento térmico ou recontaminação pós-processo.

Atualmente é possível diferenciar isolados de *M. bovis* em estirpes genéticas através da técnica de *spoligotyping* (HERMANS et al., 1991). Essa discriminação molecular pode estar associada a diferenças fenotípicas, como a resistência ou capacidade de sobrevivência do agente.

Todos esses fatos enfatizam a importância de estudos sobre a sobrevivência de diferentes espoligotipos de *Mycobacterium bovis*, especialmente de cepas isoladas no país, inoculados em substratos lácteos para a análise da segurança conferida pela maturação de queijo.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos foi necessário, antes, estabelecer as condições de estudo quanto: à inoculação do leite, segurança na fabricação do queijo contaminado, definição dos tempos de análise, formulação do meio de cultura para a análise. Esses parâmetros foram definidos em testes apresentados mais adiante, no capítulo APÊNDICES. A seguir serão apresentados o material e os métodos propostos para esse tipo de estudo.
Foram fabricadas três partidas de queijo do tipo parmesão, contaminado com *Mycobacterium bovis* espoligotipo SB1033.

## 3.1 LEITE

Doze litros de leite pasteurizado do tipo A obtidos no comércio foram colocados em recipiente estéril de alumínio e com auxílio de espátula de inox estéril foi feita a homogeneização de todo conteúdo.

## 3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Foi utilizada cultura de *Mycobacterium bovis* - espoligotipo SB1033 (isolado de bovinos em São Paulo por ROSALES, 2005) com 15 dias de cultivo em garrafas com meio de Stonebrink-Leslie, cedidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
Todo procedimento de manipulação do inóculo foi realizado em fluxo laminar, previamente descontaminado com álcool 70%, seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos.

Três garrafas contendo cultura de *M. bovis* foram numeradas e pesadas em balança de precisão. Com uma haste de plástico estéril retirou-se quantidade compatível a 600mg de colônias, colocando-as em cadinho estéril. Essa massa do *M. bovis* foi diluída em 1mL de solução salina 0,85% com 0,05% de Tween 80 e macerada vigorosamente. Em seguida, foram adicionados 24mL de solução salina 0,85% até completar 25mL de volume de inóculo, que foi transferido para erlenmeyer estéril com presença de pérolas de vidro para evitar formação de grumos. A figura 2 ilustra este procedimento de preparo do inóculo.

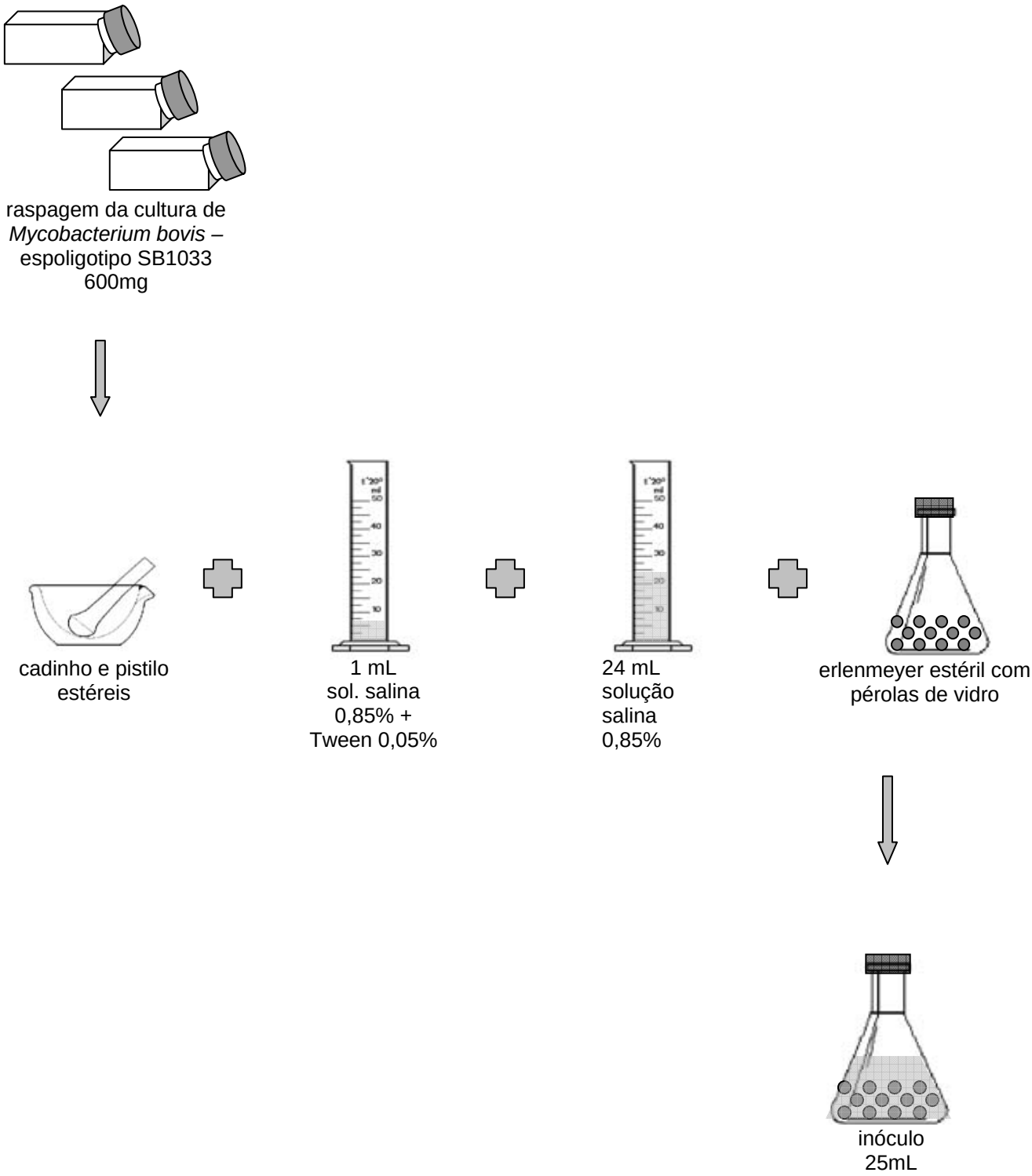


Figura 2 – Preparação do inóculo de *Mycobacterium bovis*

## 3.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura Stonebrink-Leslie foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANA DE ZOONOSIS, 1985). A cada 120mL de meio de cultura foi adicionado um coquetel de antibióticos conforme a seguinte formulação: 3,865mg Polimixina B 6000U, 0,6mg Anfotericina B, 2,4mg Ácido Nalidíxico e 0,6mg Trimetropina, que foram diluídos em 3mL de água estéril e filtrados, com seringa estéril e filtro de poro 0,22UM da marca Millipore estéril (Apêndice B).

## 3.4 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO

Os 12 litros de leite foram contaminados com 5mL de inóculo e aquecidos em banho maria até atingir a temperatura de 32 a 35°C, quando foram coletados 9mL para primeira análise (controle de contaminação do leite). A esta temperatura foi feita a adição de uma porção do fermento (TCC20, Thermophilic Culture Blend Freeze-dried Lactic Culture for Direct Vat Set - DVS, CHR Hansen), que foi previamente preparado como descrito a seguir: o pacote de fermento foi diluído em 500mL de leite esterilizado UHT, homogeneizado em liquidificador estéril e separado em porções de 12mL em recipientes estéreis). Esperou-se 30 minutos para adaptação do fermento. Em seguida foram adicionados 6mL de cloreto de cálcio, 6mL de nitrato de sódio, 2,4mL de ácido lático previamente diluído em 240mL de água destilada estéril e 3mL de coagulante previamente diluído em 60mL de água destilada estéril. Foi realizada a homogeneização vigorosa por 2 minutos e aguardado mais 30 minutos para a coagulação da massa (coalhada), que então foi cortada com utilização de faca e espátula de inox estéril até atingir tamanho de “meio grão de arroz”. Realizou-se homogeneização lenta por 20 minutos aquecendo a massa até atingir 44°C, e homogeneização vigorosa até atingir 50°C, o que demorou em torno de 1hora.

A cada movimentação do leite e/ou da coalhada foram utilizados utensílios de inox estéreis e descartados em seguida para evitar contaminação.

Quando a coalhada atingiu o ponto de consistência unificada, foi feita a sua transferência para a forma do dessorador e descartado o soro. O dessorador foi colocado em recipiente plástico estéril e prensado com peso de 5kg (este foi envolvido em saco plástico e previamente autoclavado), tampado e deixado em refrigerador à 25°C por 24 horas para retirada do excesso de soro e compactação do queijo.

Após a prensagem foi feita a salga em outro recipiente plástico estéril com solução a 20% de sal por duas horas, e em seguida realizado um banho com solução aquosa a 0,075% de natamicina (1,5 g de Natamax® em 1000 ml de água) para reduzir crescimento de fungos na superfície do queijo. Todos os procedimentos foram realizados dentro do fluxo laminar. A natamicina é aprovada para uso em queijos pela Portaria 146 MAPA (BRASIL, 1996). Os apêndices D e E descrevem os estudos realizados para definir o antifúngico a ser empregado nessa etapa.

O queijo foi depois transferido para recipiente estéril de vidro com tampa de vidro e lacrado com parafilm® e mantido em refrigerador a 18°C para secagem e maturação.

Toda manipulação posterior do queijo foi feita dentro do fluxo laminar.

Foram realizados tombos diários nos três primeiros dias e tombos semanais, que foram feitos nos dias de coleta para análise, até atingir 63 dias de maturação. A cada tombo do queijo, ele foi transferido para outro conjunto de recipientes de vidro, ficando assim, sempre fechado durante a cura, evitando a disseminação da contaminação no ambiente. A figura 3 e 4 ilustram o procedimento de fabricação do queijo.

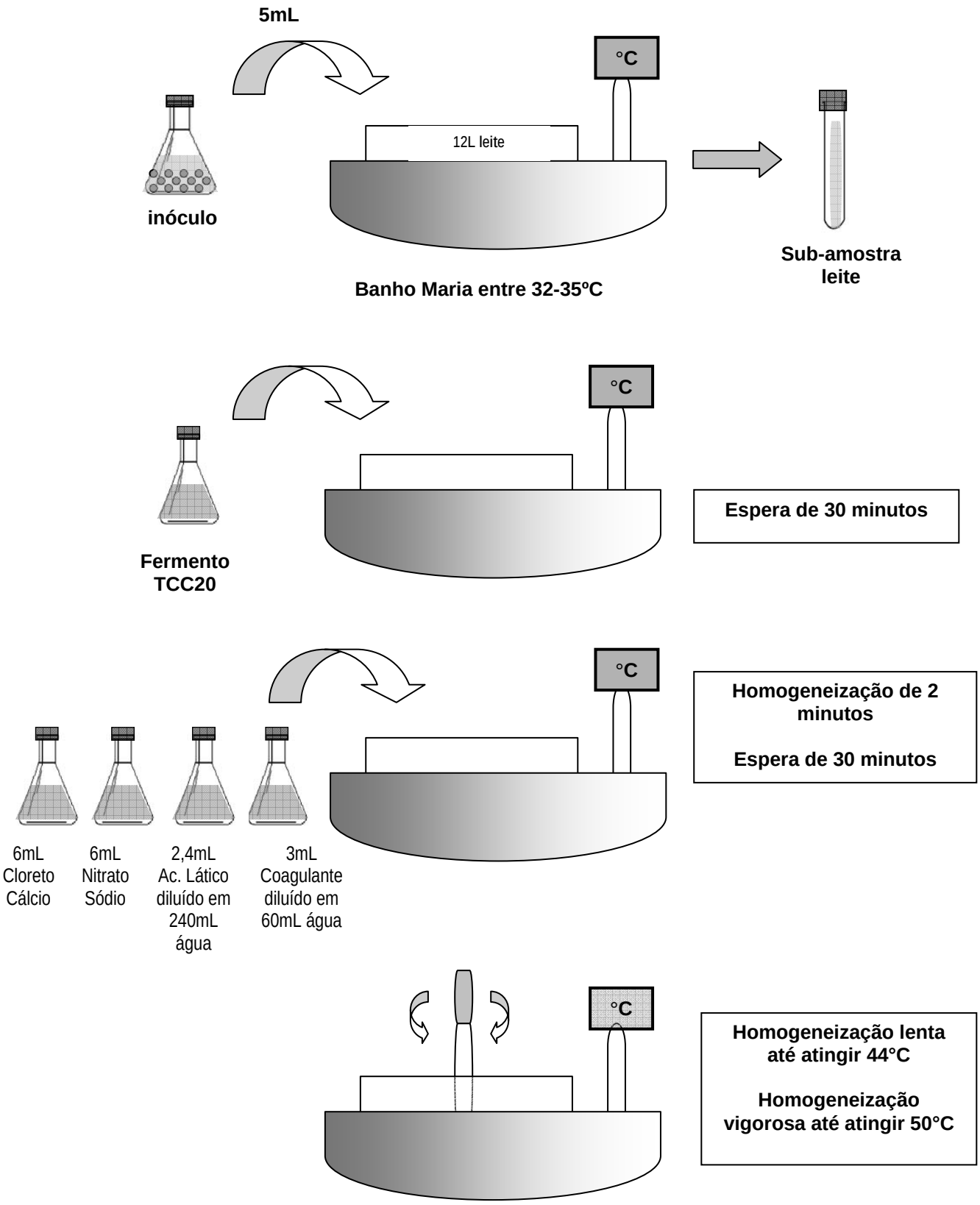


Figura 3 – Fabricação do Queijo tipo Parmesão (etapa 1)

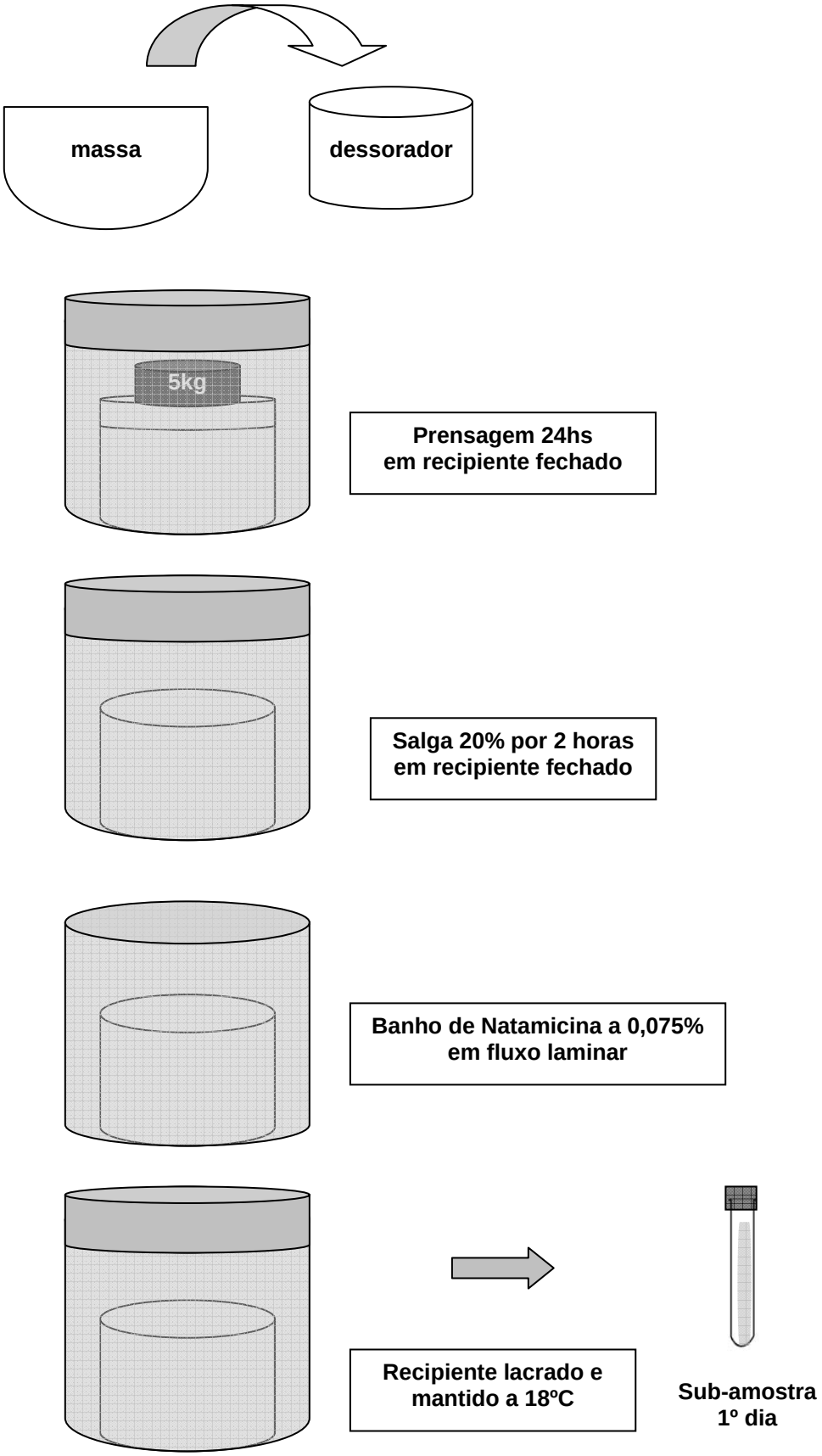


Figura 4 – Fabricação do Queijo tipo Parmesão (etapa 2)

## 3.5 COLETA E ANÁLISE QUANTITATIVA

Foram feitas coletas do leite recém contaminado e do queijo nos seguintes dias de maturação: 1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º e 63º dia.

A cada coleta foram retirados 25g de queijo com uso de utensílios estéreis, que foram colocados em embalagem estéril de plástico para stomacher, foi adicionado 225mL de água peptonada a 0,1% e colocado para macerar em stomacher da marca comercial Laboratory Blender STOMACHER 400 em velocidade normal por 60 segundos.

Esse conteúdo foi submetido à diluição decimal seriada até $10^{-5}$, usando como diluente a solução peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização vigorosa, 100µL de cada diluição foi semeado, empregando micropipetas estéreis, na superfície de meio Stonebrink-Leslie em garrafas, em duplicatas. As garrafas foram incubadas por 45 dias em estufa a 36°C.

Após 24hs de semeadura as garrafas foram totalmente fechadas. A figura 4 ilustra este procedimento de análise quantitativa.

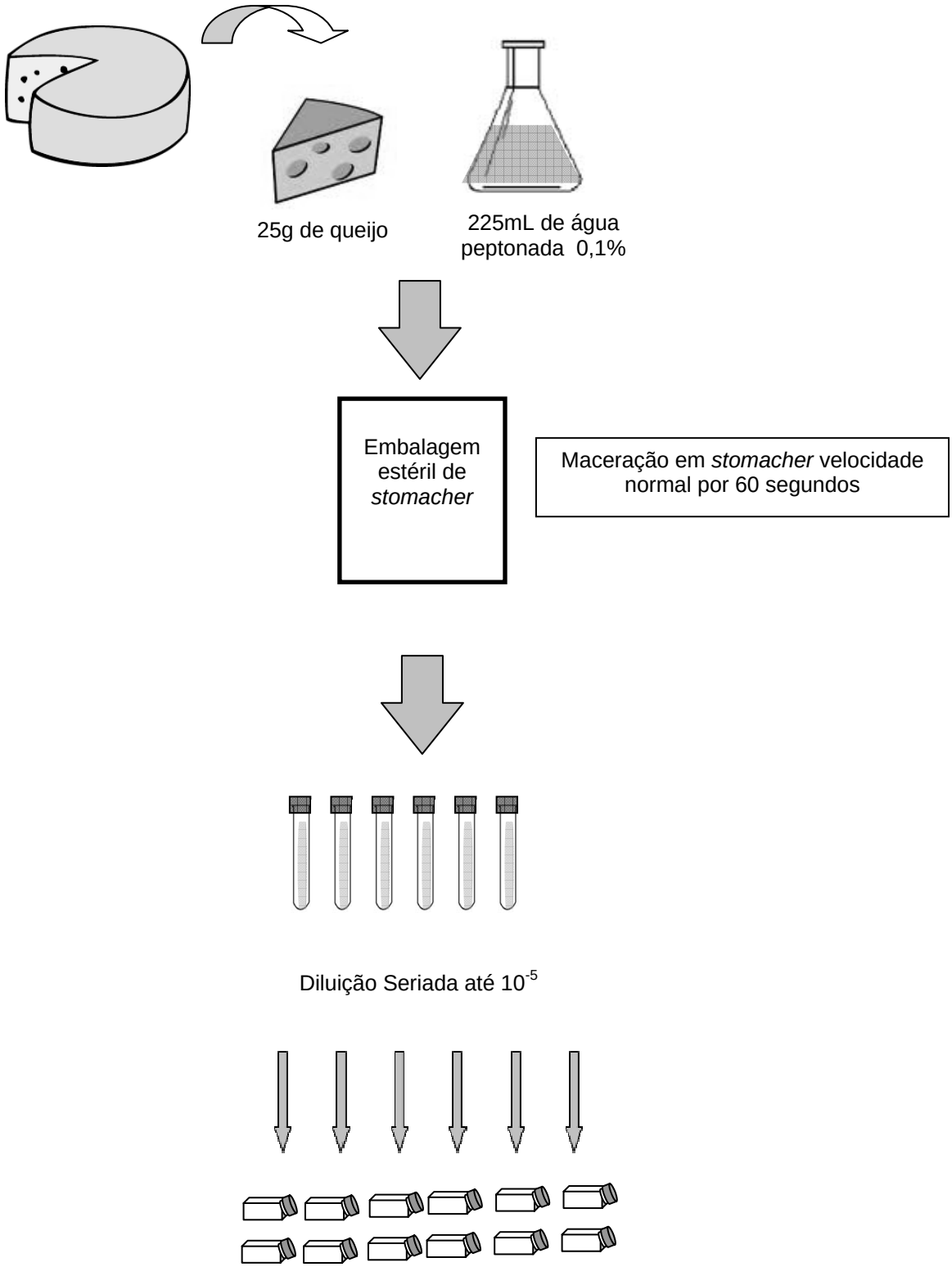


Figura 5 – Análise Quantitativa

## 3.6 CONTAGEM DE COLÔNIAS E REGISTRO DE RESULTADOS

Para registro dos resultados, considerou-se a média das UFC entre as duplicatas da diluição que apresentou entre 10 e 150 colônias. Esses valores foram transformados em log.

Os dados dos queijos fabricados geraram gráficos com os resultados das contagens (log de sobreviventes) na ordenada e os respectivos dias de análise na abcissa. Ao gráfico foi acrescida a linha de tendência de regressão linear e a equação da reta, e a partir da equação obtida, o valor $D_{18°C}$ do *M. bovis* para cada queijo foi calculado. Foi então calculado o valor médio de $D_{18°C}$, ponderado pelas incertezas do valor $D_{18°C}$ de cada queijo.

Os resultados da análise do controle de contaminação do leite não foram considerados para a construção da reta, apenas os resultados provenientes durante a maturação.

## 3.7 MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

Durante a fabricação do queijo apenas as pessoas autorizadas e devidamente paramentadas com equipamento de proteção individual (EPI) permaneceram no laboratório. Não houve saída ou entrada de outras pessoas no recinto até finalizar o processo. Os EPIs utilizados foram: avental de mangas compridas com o fechamento atrás, outro avental amarrado na cintura (de modo a proteger também as pernas), touca, duas luvas de borracha em cada mão (a de cima era constantemente trocada, de modo a reduzir a chance de disseminar a contaminação para outros utensílios ou ambiente), óculos e máscara *air safety*, todos descartáveis. Além disso, as pessoas usavam calças compridas, avental de algodão de mangas longas (por baixo do descartável) e botas de borracha.

Após o uso, todo material descartável foi acondicionado em saco plástico autoclavável para posterior esterilização (121°C/15min.). Os aventais de algodão foram separados em outro saco e também foram autoclavados e, depois, foram lavados com água sanitária (2,5% de hipoclorito de sódio) diluída 1:10 v/v. As botas foram lavadas com solução de formol (lysoform 1:10 v/v). Todos os utensílios empregados na fabricação e os resíduos da fabricação, como a água do banho maria, o soro do queijo e sobra de massa do queijo, sofreram primeiramente, uma desinfecção química e, no dia seguinte uma desinfecção física em autoclave (121°C/15min.). Para tanto, havia dois recipientes plásticos revestidos de saco plástico autoclavável, um com solução de formol (lysoform 1:10 v/v ou mais concentrado) para o descarte dos utensílios de alumínios ou aço inoxidável e outro com água sanitária (1:2 v/v) para os utensílios de plástico ou vidro. Finalizada a fabricação do queijo, os sacos plásticos contendo os utensílios mergulhados nas soluções desinfetantes foram fechados para posterior autoclavação.

O laboratório foi então fumigado com permanganato de potássio acrescido de solução de formol e permaneceu fechado por 24 horas (quatro recipientes com cerca de uma colher de sopa de permanganato e 50 ml de formaldeído P.A.). Todo o material a ser descartado/autoclavado permaneceu no laboratório nesse período.

A cada coleta e análise das amostras também foram utilizados os seguintes EPIs: avental de mangas compridas, touca, duas camadas de luvas de borracha e máscara, todos descartáveis. Ao final do procedimento todo o EPI foi acondicionado em sacos plásticos para autoclavagem (121°C/15min.). Após a leitura e registro das contagens, as garrafas de meio de cultura foram autoclavadas antes de serem descartadas.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cura do queijo tipo parmesão durante o período de 63 dias a 18°C determinou uma redução média de 1,36 log UFC/g do *Mycobacterium bovis*, os resultados das contagens dos três queijos fabricados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das contagens (log UFC/g) de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo 1033) no leite e no queijo tipo parmesão durante a cura a 18°C

| Análise | Queijo 1 | Queijo 2 | Queijo 3 | Média* |
|---|---|---|---|---|
| Leite | 6,03 | 6,12 | 6,00 | 6,01 |
| Dia 1 | -** | 5,26 | 5,48 | 5,48 |
| Dia 7 | 5,30 | 4,65 | 5,68 | 5,49 |
| Dia 14 | 5,00 | 3,66 | 4,97 | 4,98 |
| Dia 21 | 4,90 | 3,85 | 4,54 | 4,72 |
| Dia 28 | 4,57 | 2,70 | 4,28 | 4,42 |
| Dia 35 | 5,00 | - | 4,30 | 4,65 |
| Dia 42 | 3,85 | - | 4,08 | 3,97 |
| Dia 49 | 4,32 | - | 4,34 | 4,33 |
| Dia 56 | 4,10 | - | 3,70 | 3,90 |
| Dia 63 | 4,30 | - | 3,93 | 4,12 |

* para cálculo da média foram considerados os valores do queijo 1 e 3
** valores perdidos por contaminação do meio de cultura

Observa-se que a contaminação do leite é bastante semelhante à do queijo recém-fabricado, apesar de haver perda de líquido (soro) durante o processo. Isso poderia ser explicado pela afinidade que o *Mycobacterium* tem pela gordura (MCFADDEN, 1992) e pela concentração de sólidos no queijo.

A seguir estão apresentados os gráficos 2 e 3, que ilustram as curvas de sobreviventes (e suas equações) do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB 1033) obtidas a partir das contagens nos queijos 1 e 3 durante o período de maturação a 18°C.

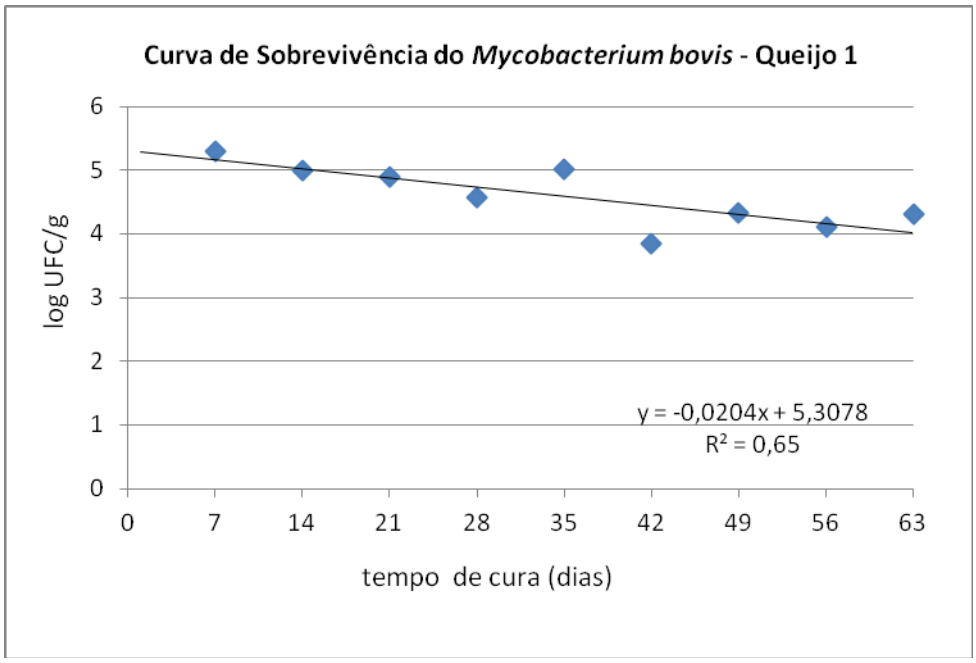


Gráfico 2 - Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB 1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo 1 durante o período de maturação a 18°C

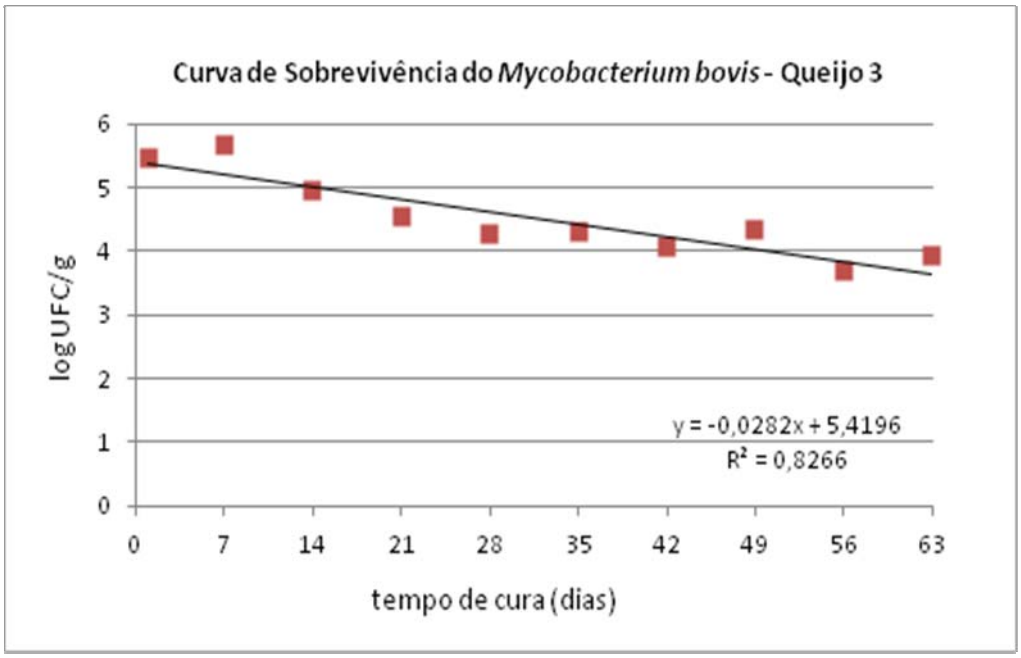


Gráfico 3 - Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB 1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo 3 durante o período de maturação a 18°C

Os resultados do queijo 2 foram desconsiderados para fins estatísticos porque houve contaminação abundante por fungos, tanto no queijo quanto no meio de cultura, que pode ter afetado negativamente a sobrevivência e contagem das

colônias. Algumas amostras foram perdidas devido à destruição do meio de cultura pelos contaminantes fúngicos.

Os valores de $D_{18°C}$ encontrados foram de 49,0 dias no queijo 1 e de 35,5 dias no queijo 3. A média, ponderada pelas incertezas, foi de 37,5 ± 5,3, o que significa dizer que, com 95% de confiança, o valor $D_{18°C}$ está compreendido entre 26,9 e 48,1 dias. A realização de maior número de estudos de decaimento do agente à cura poderá reduzir as incertezas e, assim, reduzir a amplitude dos resultados prováveis para esse parâmetro.

Algumas pesquisas confirmam a presença de *Mycobacterium* spp. em alimentos e em particular no queijo, com a identificação do *M. bovis* (KASTLI; BINZ, 1949 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; HAMMER; BABEL, 1957 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; HAHN, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; IOTOV; TODOROV, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200; LAFONT; LAFONT, 1981 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200), porém a literatura sobre a inativação do *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijos é limitada.

Há estudos com o *Mycobacterium avium paratuberculosis* (SUNG; COLLINS, 1998; SPAHR; SCHAFROTH, 2001; DONAGHY; TOTTON; ROWE, 2004) e outros microrganismos patogênicos (RYSER; MARTH, 1987; YOUSEF; MARTH, 1988; YOUSEF; MARTH, 1990; LOPEZ; SÁNCHEZ, 2000; ERKMEN, 2000), mas é importante ressaltar que a comparação dos resultados obtidos por esses autores com os dados desta pesquisa deve ser cuidadosa, uma vez que taxa de inativação de um patógeno pode ser influenciada pelas características do próprio agente e pelas características intrínsecas e extrínsecas do queijo em questão.

Spahr e Schafroth (2001), em pesquisas com *M. avium paratuberculosis* encontraram valor D de 27,8 dias em queijo suíço duro (o qual foi submetido a maturação com diferentes combinações de temperaturas: 10 dias a 12°C seguido de 60 dias a 22°C e finalizado com 50 dias a 12°C) e valor $D_{15°C}$ de 45,5 dias em queijo suíço semi-duro. Esses resultados estão dentro dos valores possíveis para o valor D desta pesquisa. Isso causa surpresa, uma vez

que a literatura indica que o *M. paratuberculosis* é mais termo-resistente que o *M. bovis, Salmonella* spp.*, Coxiella* spp. e *Listeria* spp. (SUNG; COLLINS, 1998).

Porém em outros trabalhos com *M. avium paratuberculosis* os valores D obtidos foram maiores: Sung e Collins (2000) registraram valor $D_{4°C}$ de 59,9 dias em queijo branco macio (Queso Fresco); e Donaghy, Totton e Rowe (2004) obtiveram valor $D_{10°C}$ de 107, 96 e 90 dias para 3 diferentes cepas em queijo tipo cheddar.

Vários autores realizaram trabalhos que mostraram a presença do *Mycobacterium bovis* em diferentes tipos de queijo: *M. bovis* mostrou ser infectivo por mais que 180 dias em Camembert, 220 dias em Cheddar (HAMMER; BABEL, 1957 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200) e 2 meses em Camembert e Edam (HAHN, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200). Bacilo virulento da tuberculose foi encontrado em queijo branco Búlgaro, feito com leite artificialmente infectado, depois de 120 dias de armazenamento (IOTOV; TODOROV, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200). Em queijo Emmental Suiço células infectivas de *M. bovis* foram encontradas depois de 5 dias, em Gruyere depois de 22 dias, em Camembert por 47 dias e em queijo Tilsitier Suiço depois de 305 dias (KASTLI; BINZ, 1949 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200). Em seis queijos Emmental feitos com leite artificialmente contaminado, um deles causou tuberculose quando inoculado em cobaias após três meses de maturação (HAHN, 1959 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200). Em queijo azul feito com leite cru contaminado, o *M. bovis* ainda estava presente após 3 a 4 meses de maturação (LAFONT; LAFONT, 1981 apud SPAHR; SCHAFROTH, 2001, p. 4200).

Com relação a outros microrganismos patogênicos López e Sánchez (2000) contaminaram leite integral com cerca de $10^6$ UFC/ml de *Listeria monocytogenes* e fabricaram dois queijos mexicanos (Manchego e Chihuahua). As contagens permaneceram constantes no queijo Manchego até o fim da maturação (realizada a 12°C por 5 dias) e reduziram para $4x10^4$ UFC/g no queijo Chihuahua, no final da maturação (realizada a 12°C por 6 semanas).

Erkmen (2000) verificou que a *Listeria monocytogenes* sobreviveu mais que 90 dias de maturação em queijo branco tipo turco feito com e sem cultura “starter”, maturado a 4°C. Ryser e Marth (1987) verificaram a sobrevivência por mais que 1 ano em queijo cheddar e Yousef e Marth (1988) reportam sobrevivência desse patógeno por mais que 14 dias em queijo Colby.

Yousef e Marth (1990) também contaminaram leite com $10^4$ a $10^5$ UFC/ml de *L. monocytogenes* para fabricar um queijo do tipo parmesão, porém durante a maturação a 12.8°C, o número de microrganismos diminuiu quase linearmente, e não foram detectadas células nos queijos após 2 até 16 semanas de maturação.

A amplitude da resposta obtida neste trabalho (valor de $D_{18°C}$ entre 26,9 e 48,1 dias) provavelmente é decorrente do baixo número de queijos testados. Mas reforça a necessidade deste tipo estudo para a obtenção de informações mais precisas sobre o valor D, inclusive em diferentes temperaturas, já que provavelmente afetará a velocidade metabólica do agente e, por consequência, o tempo de decaimento da população. É preciso salientar que estudos futuros devem envolver cepas de campo recém-isoladas, pois isso tende a aumentar a resistência dos patógenos, quando comparada a cepas que são mantidas em laboratório por longo período (PEARCE et al., 2001; KLINJIN; HERREWENGH; JONG, 2001).

Outros dois aspectos que também devem ser avaliados em estudos futuros são: a cura de diferentes queijos, porque a microbiota utilizada para fabricação do produto pode ter efeito sinérgico ou antagônico com o patógeno e as características finais de pH e atividade de água – Aw / umidade do queijo, que são fatores intrínsecos e modulam a cinética de multiplicação e morte dos patógenos (JAY, 2000b), e a possível variabilidade no tempo de decaimento entre diferentes variantes genéticas desta espécie (SUNG; COLLINS 2001).

Outro fator que pode afetar a resistência do patógeno à cura é o teor de gordura do queijo e espécie de origem do leite. Nishimoto (2006) observou maior resistência térmica à pasteurização lenta do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) em leite integral quando comparado ao leite desnatado. Starikoff

(2006), em estudo similar, empregou leite de cabra como substrato e também observou que a cinética de morte é mais rápida em leite desnatado, embora a gordura tenha tido um efeito protetor menos evidente. Depreende-se daí que, talvez, os queijos com teor de gordura elevado tenham necessidade de maior tempo de maturação para conferir o mesmo nível de segurança que aqueles com menos gordura.

A obtenção desse tipo de dado é de grande relevância em estudos de "Avaliação do Risco" de se adquirir tuberculose por *Mycobacterium bovis* ao se consumir queijos curados elaborados com leite cru e, então, subsidiar o governo com informações valiosas para o "Gerenciamento do Risco" que, entre outras, estabelecerá as medidas de mitigação do risco. Essa abordagem de estudo faz parte da metodologia de "Análise de Risco".

# 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que o assunto merece aprofundamento, pois os resultados deste estudo indicam que a cura por 60 dias pode não garantir a redução do *Mycobacterium bovis* para níveis seguros, admitindo que o leite possa ter 4 log UFC/mL (BALL, 1943).

O protocolo ora apresentado pode ser empregado para estudos sobre o decaimento da população de *Mycobacterium bovis* em queijos durante a cura e requer um maior número de repetições do processo para se obter resultados mais precisos que permitam estimar o nível de segurança que a cura confere ao queijo.

## REFERÊNCIAS

AMADO, J. E. S. **MG: Portaria dificulta comercialização de queijo artesanal mineiro, patrimônio nacional**. Rede de Inovação Tecnológica para Defesa Agropecuária (blog). Disponível em: <http://inovadefesa.ning.com/profiles /blogs/mg-portaria-dificulta>. Acesso em: 27/07/2010.

AMBROSIO, S. R. **Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BALL, C. O. Short-time pasteurization of milk. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 35, p. 71-84, 1943.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite.** Ed. Nobel, 1991. p. 165-170.

BESSER, R. E.; PAKIZ, B.; SCHULTE, J. M.; ALVARADO, S.; ZELL, E. R.; KENYON, T. A.; ONORATO, I. M. Risk factors for positive mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. **Pediatrics**, v. 108, n. 2, p. 305-310, 2001.

BORTOLETO, E. E.; CROCETTA, I. **Leite:** realidade e perspectivas. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**.** Brasil, 1997. p.14-38.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. Brasília – DF, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes** – Métodos Físico-Químicos. Brasília – DF, 1981.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria 146 de 7 de março de 1996**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344> Acesso em: 18 out 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 353, de 04 de setembro de 1997.** Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Parmesão, Parmesano, Sbrinz, Reggiano E Reggianito, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT.** Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. 188 p.

CORNER, L. A.; TRAJSTAMAN, A. C. An evaluation of 1-Hexadecylpyridinium Chloride as a decontamination in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. **Veterinary Microbiology**, n. 18, p.127-134, 1988.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciossas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Ed. Varela, 1983. 823p.

COUSINS, D. V.; WILLIAMS, S. N.; DAWSON, D. J. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: DNA typing of isolates, 1970-1994. **International Journal Tubercle Lung Disease**, v. 3, n. 8, p. 722-731, 1999.

DANKNER, W. M.; DAVIS, C. E. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the baja California Region. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. 79, 2000.

DONAGHY, J. A.; TOTTON, N. L.; ROWE, M. T. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* from cheddar cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 285-291, 2003.

DONAGHY, J. A.; TOTTON, N. L.; ROWE, M. T. Persistence of *M. paratuberculosis* during manfacture and ripening of cheddar cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4899-4905, 2004.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite. **Estatísticas do leite:** produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000 - 2005. Disponível em: < http://www.cnpgl.embrapa.br/producao/dados2002/producao/2.31.htm>. Acesso em: 25 fev 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite. **Estatísticas do leite:** produção brasileira x leite (SIF)**.** Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/producao/04industria/grafico04.01b.php>. Acesso em: 25 fev 2008.

ERKMEN, O. Inactivation kinectics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period. **Journal of Food Engineering,** v. 46, p. 127-131, 2000.

FDA. **Issues health advisory about certain soft cheese made from raw milk,** FDA STATEMENT, March 14, 2005. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2005/ucm108420.htm>. Acesso em: 08 nov 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. **In: Controle do desenvolvimento microbiano nos Alimentos**. Atheneu, 1996. p. 111.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 253-256, 1996.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis.* **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 166-170, 1998.

HARRIS, N. B.; PAYEUR, J. B.; BRAVO, D.; OSORIO, R.; STUBER, T.; FARELL, D; PAULSON, D.; TREVISO, S.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; CERNEK-HOSKINS, S.; RAST, R.; GINSBERG, M.; KINDE, H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese originating in Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1025-1028, 2007.

HERMANS, P. W. M.; van SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; de HAAS, P. E. W.; DALE, J. W.; van EMBDEN, J. D. A. The insertion element IS 987 from *M. bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* Complex strains. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 2695-705, 1991.

HUEBNER, R. J.; JELLISON, W. L.; BECK, M. D.; WILCOX, F. P. Q fever studies is southern California: III Effects of pasteurization on survival of *Coxiella burnetti* in naturally infected milk. **Public Health Reports**, v. 64, n. 16. p. 499-511, 1949.

JAY, J. M. High-temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. **Modern Food Microbiology**, 6th ed. Gaithersburg: Maryland, 2000(a). p.341-362.

JAY, J. M. Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. **Modern Food Microbiology**, 6th ed. Gaithersburg: Maryland, 2000(b). p.35-56.

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KUSILUKA, L. J. M.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M; KAMBARAGE, D. M. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. **Tropical Animal Health and Production,** v. 30, n. 4, p. 233-239,1998.

KINDE, H.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; ADAMS, C.; WALKER, R.L.; CERNEK-HOSKINS, S.; TREVISO, S.; GINSBERG, M.; RAST, R.; HARRIS, B.; PAYEUR, J. B.; WATERMAN, S.; ARDANS, A. Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the USA through a noncomercial land port of entry – 2006. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 1, p. 47-52, 2007.

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origen bovino y salud publica. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v.3, p.55-76, 1984.

KLINJIN, N.; HERREWENGH, A. A. P. M.; JONG, P. Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; implications for interpretation. **NIZO Food Research,** n. 91, p. 697-704, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JUNIOR, W. C. W. Diagnóstico Microbiológico. In: **Micobactérias**, Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 903-946.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil, **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, 2003.

LOBUE, P. A.; BETACOURT, W.; PETER C.; MOSER K. S. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994–2000. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 2, p. 180-185, 2003.

LÓPEZ, C. S.; SÁNCHEZ, H. H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. I**nternational Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 149-153, 2000.

MCFADDEN, J. J.; COLLINS, J.; BAEMAN, B.; ARTHUR, M.; GITNICK, G. Mycobacteria in Crohn´s disease: DNA probes identify the Wood Pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. **Journal Clinical Microbiology,** v. 30, p. 3070-3073, 1992.

NISHIMOTO, É. J. **Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65}{}^{o}{}_{C}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal Hygiene**, v. 7, p. 147-173, 1927.

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

PEARCE, L. E.; TRUONG, H. T.; CRAWFORD, R. A.; YATES, G. F.; CAVAIGNAC, S.; LISLE, G. W. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3964-3969, 2001.

PINHEIRO, S. R. **Avaliação da atividade de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999.** 2001. 93 fls. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PIVETTA, M. Ferro na tuberculose. **Ciência e Tecnologia no Brasil - Pesquisa FAPESP**, n. 97, p. 32-37, março 2004.

ROSALES, C. A. R. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos.** São Paulo. 2005. 86 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, () v. 50, n. 1, p. 7-13, 1987.

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA 24, de 02 de agosto de 1994.** Normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para a aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos de produtos de origem animal. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#>. Acesso em: 12 jul 2006.

SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. C. A.; BARCELLOS, D. E. S. N.; LOPEZ, A. C. Limpeza e desinfecção. In: **Suinocultura intensiva.** Produção, manejo e saúde do rebanho. Concórdia: Embrapa, 1998. p. 13-134.

SOUZA, P. H. Veterinários querem erradicar no país a tuberculose bovina. **Gazeta Mercantil**, n. 4-5, p. 19. 1999.

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

STABEL, J. R. Effective methods for postharvest intervention in dairy processing. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 10-15, 2003.

STABEL, J. R. On-Farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. **Journal of Dairy Science,** v. 84, p. 524-527, 2001.

STARIKOFF, K. R. **Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor D65oC do Mycobacterium fortuitum (NCTN 8573).** 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 999-1005, 1998.

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

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polimerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Mycrobiology**, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.

TERRUGI, C. H. B. **Padronização de metodologia para recuperar *M.bovis* veiculado pelo leite e derivados**. 2000. 72f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2000.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.;VIEIRA, M. C.; GRAEL, E. T.; BARBIERI, M. K.; SOUZA, F. K. H.; ALMEIDA; A. R.; POMPEIA, J. C. A.; MARTINI, M.; LEAL, C. M.; LIMA, Z. M. B.; PRADO, M. V.; SCARCELLI, E.; ROXO, E.; BALDASSI, L.; TEIXEIRA, A. C.; PAULIN, L. M.; GENOVEZ, M. E. Caracterização microbiológica, microscópica e físico-química de produtos lácticos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, v. 3, n. 6, p. 212-216, 2003.

WINTERS, A.; DRIVER, C.; MACARAIG, M,.; CLARK, C.; MUNSIFF, S.S.; PICHARDO, C.; DRISCOLL, J.; SALFINGER, M.; KREISWIRTH. B.; JEREB, J.; LOBUE, P.; LYNCH, M. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* --- New York City, 2001—2004. **Revista Eletrônica MMWR**, v. 54, n. 24, p. 605-608, 2005.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Behavior of Listeria monocytogenes during the manufacture and storage of Colby cheese. **Journal of food protection**, v. 51, n. 1, p. 12-15, 1988.

YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3351-3356, 1990.

# APÊNDICE A - Projeto Piloto “Reprodução da Fabricação de Queijo Parmesão em Laboratório”.

## Objetivos

Reproduzir a fabricação de queijo do tipo parmesão em condições de laboratório e definir todos os procedimentos de segurança a serem adotados na fabricação do queijo contaminado.

## Material e Métodos

Dez litros de leite pasteurizado do tipo A foram utilizados para fabricar o queijo do tipo parmesão conforme procedimento já descrito no item 3.4. Depois de pronto, o queijo foi transferido para recipiente de vidro estéril e mantido em refrigerador a 20°C para secagem e maturação. Foram realizados tombos diários nos três primeiros dias e tombos semanais até atingir 30 dias de maturação.

## Conclusão

Durante este piloto foram definidas e aperfeiçoadas as etapas de fabricação de queijo tipo parmesão para condições de laboratório e para pequena proporção de volume de leite, além de definir quantidade de material estéril a ser previamente preparado, tempo necessário para a realização de cada etapa de fabricação e meios de descarte do material contaminado. Conclui-se reajustar o volume de leite foi reajustado para 12 litros com intuito de fabricar um queijo um pouco maior.

APÊNDICE B - Projeto Piloto “Definição da formulação do meio de cultura a ser empregado em testes de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijos”.

Objetivos

Comparar o crescimento do *Mycobacterium bovis* em duas formulações de meio acrescidos de antibióticos: uma manipulada no laboratório e outra adicionada de um produto comercial Panta®.

Justificativa

Como não há uma metodologia oficial para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em produtos lácteos, foi necessário encontrar uma formulação de meio que inibisse o crescimento das bactérias láticas do queijo, permitindo o crescimento do patógeno, que é lento.

Donaghy; Totton; Rowe, (2003) analisaram a viabilidade *M. paratuberculosis* em queijo e empregaram um meio adicionado do produto Panta®. Ocorre que esse produto é muito caro e, portanto, a alternativa foi formular o meio de cultura com os mesmos antibióticos presentes no produto comercial. No entanto, um dos antibióticos desta formulação não foi encontrado no Brasil (azlocilina) e assim, foi testado o meio adicionado dos outros antibióticos: Polimixina, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico e Trimetropina.

Material e Métodos

Foi utilizada cultura de *Mycobacterium bovis* - espoligotipo 1033 (ROSALES, 2005) com 15 dias de cultivo em garrafas com meio de Stonebrink-Leslie, cedidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP. O inóculo foi preparado conforme procedimento descrito no item 3.2.

Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar, previamente descontaminado com álcool 70%, seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos.

Foram utilizados 25g de queijo parmesão adquirido do comércio, os quais foram transferidos para embalagem estéril de plástico para *stomacher*, acrescidos de 225mL de água peptonada a 0,1% e colocados para macerar em *stomacher* da marca comercial Laboratory blender STOMACHER 400 em velocidade normal por 60 segundos.

Esse conteúdo foi submetido à diluição decimal seriada até $10^{-7}$, usando como diluente a solução peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização vigorosa em vórtex por 10 segundos, 0,1µL de cada diluição foi semeado, empregando micropipetas estéreis, em garrafas contendo meio Stonebrink-Leslie, que foram incubadas por 45 dias em estufa a 36°C.

O meio de cultura Stonebrink-Leslie foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANA DE ZOONOSIS, 1985). Em uma porção de 120mL de meio de cultura foi adicionado um coquetel de antibióticos conforme a seguinte formulação: 3,865mg Polimixina B 6000U, 0,6mg Anfotericina B, 2,4mg Ácido Nalidíxico e 0,6mg Trimetropina, que foram previamente diluídos em 3mL de água estéril e filtrados, com seringa estéril e filtro de poro 0,22UM da marca Millipore estéril. Em outra porção de 120mL de meio de cultura foi adicionado um frasco de Panta® que contém em sua fórmula Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetropina e Azlocilina.

Resultados

O crescimento das colônias de *Mycobacterium bovis* não foi influenciado pela formulação dos meios: $1,6x10^8$ UFC no meio formulado e $1,4x10^8$ UFC no meio com o Panta®.

Conclusão

Optou-se pelo emprego do meio formulado para os testes da tese.

APÊNDICE C - Projeto Piloto “Avaliação do Sorbato de Potássio como antifúngico em queijos para estudos de viabilidade do *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijos”.

Objetivos

Avaliar se o sorbato de potássio tem ação inibitória do sobre o *Mycobacterium bovis*.

Justificativa

Tanto o sorbato de potássio e quanto a natamicina são aprovados para uso como antifúngicos na superfície de queijos pelo MAPA (BRASIL, 1996), porém o sorbato de potássio foi mais facilmente encontrado no comércio e por isso foi a primeira escolha no teste.

Material e Métodos

Foi utilizada cultura de *Mycobacterium bovis* - espoligotipo SB1033 (ROSALES, 2005) com 15 dias de cultivo em garrafas com meio de Stonebrink-Leslie, cedidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP. O inóculo foi preparado conforme procedimento descrito no item 3.2.

O inóculo foi submetido à diluição decimal seriada até $10^{-13}$, usando como diluente a solução peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização vigorosa em vórtex por 10 segundos, 0,1µL de cada diluição foi semeado em garrafas contendo meio Stonebrink-Leslie, preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANA DE ZOONOSIS, 1985). Foram utilizadas quatro formulações do meio: controle (sem o sorbato de potássio) e com o sorbato de potássio a 0,1%, 0,5% e 1%. A contagem das colônias foi realizada após incubação em estufa a 36°C por 45 dias.

Resultados

Não houve crescimento de colônias em nenhum meio adicionado de sorbato de potássio enquanto o controle revelou $10^6$ UFC/ml.

Conclusão

O uso de sorbato de potássio no meio de cultura interferiu negativamente na sobrevivência e crescimento do *Mycobacterium bovis.* Assim, decidiu-se por não incorporá-lo ao meio de cultura.

Apêndice D - Projeto Piloto “Decaimento da população de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo banhado com sorbato de potássio”.

Objetivos

Verificar a ação inibitória do sorbato de potássio no crescimento de fungos na superfície do queijo fabricado durante o período de maturação.

Justificativa

Como ainda não havia sido possível a obtenção da natamicina para avaliação, decidiu-se prosseguir com os testes e fabricar o queijo contaminado, utilizando o sorbato de potássio em banho superficial do queijo de forma a reduzir a contaminação externa do queijo por fungos que deterioram o meio de cultura, inviabilizando a análise.

Material e Métodos

O queijo foi fabricado conforme procedimento já descrito no item 3.4.

Após a salga foi realizado um banho com solução aquosa a 20% de sorbato de potássio (Portaria 146 MAPA – Brasil 1996), dentro do fluxo laminar. O queijo foi depois transferido para recipiente de vidro estéril e lacrado com parafilm® e mantido em refrigerador a 20°C para secagem e maturação.

Foram feitas coletas do leite recém contaminado e da coalhada durante a fabricação do queijo. As posteriores coletas foram feitas nos seguintes dias de maturação do queijo: 1º, 4º, 7º, 14º, 21º, 28º, 49º, 61º, 77º dia, até completar duas análises consecutivas com ausência de crescimento do microrganismo.

Vale ressaltar que, devido aos resultados mostrados no APÊNDICE C, tomou-se o cuidado de não utilizar as áreas próximas à superfície do queijo, para análise microbiológica, pois poderiam conter maiores concentrações do sorbato de potássio utilizado no banho, o que poderia interferir no resultado.

O meio de cultura Stonebrink-Leslie foi preparado segundo o item 3.3. e a análise quantitativa do agente foi realizada conforme item 3.5.

Resultados

Os resultados obtidos na contagem das colônias (log UFC/mL ou log UFC/g) no leite contaminado, na coalhada (imediatamente antes de colocar na forma) e no queijo durante a maturação a 20°C do queijo tipo parmesão estão contidos no quadro 2.

| | Controle da contaminação do leite | Massa | Tempo (dias) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1º dia | 4º dia | 7º dia | 14º dia | 21º dia | 28º dia | 49º dia | 61º dia | 77º dia |
| **Log UFC/mL ou g** | 6,2 | 4,5 | 4,8 | 3,9 | 3,6 | 3,0 | 3,1 | 2,0 | 0 | 0 | 0 |

Quadro 2 - Resultados em log das contagens de UFC/mL ou log UFC/g de *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) no leite contaminado, na coalhada e no queijo durante a maturação do queijo tipo parmesão

O gráfico 4 ilustra a curva de sobrevivência (e a equação da reta ajustada) do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) durante a maturação do queijo a 20°C.

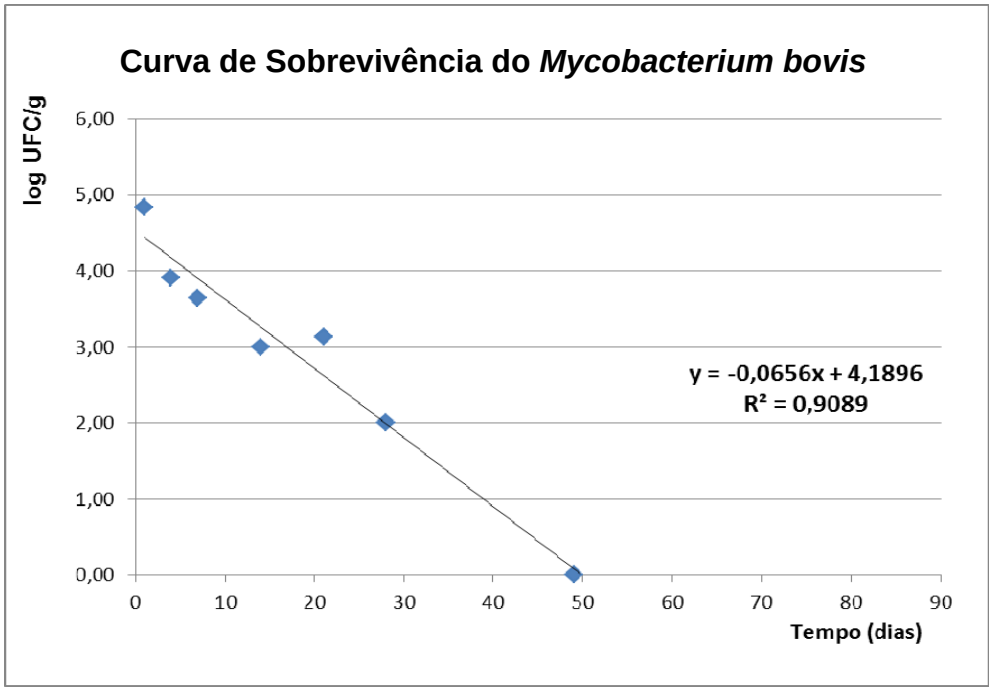


Gráfico 4 - Curva de sobrevivência do *Mycobacterium bovis* (espoligotipo SB1033) obtida a partir do log UFC/g do queijo durante o período de maturação a 20°C, e sua regressão linear

O valor $D_{20°C}$ em queijo tipo parmesão obtido a partir da equação da reta foi de 14,92 dias.

Discussão

A cura foi realizada a 20ºC, conforme orientação obtida durante o treinamento na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), mas a legislação determina que os queijos devam ser armazenados numa temperatura não superior a 18ºC, até a expedição (BRASIL, 1997).

Foi necessária a reaplicação do sorbato de potássio após cada coleta de amostra porque com a retirada de uma fatia do queijo havia crescimento de fungos na superfície que ficava exposta. Acredita-se que esse fato possa ter aumentado o efeito negativo do sorbato de potássio sobre o *M. bovis*.

Conclusão

Nas condições do experimento não foi possível avaliar quanto do decaimento do *M. bovis* foi uma função do tempo de cura e quanto foi devido ao efeito negativo dos banhos sucessivos de sorbato de potássio.

APÊNDICE E - Projeto Piloto “Avaliação da Natamicina como antifúngico em queijos para estudos de viabilidade do *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijos”.

Objetivos

Avaliar se a natamicina tem ação inibitória do sobre o *Mycobacterium bovis*.

Justificativa

Devido à necessidade de banhos sucessivos do antifúngico a cada corte do queijo, o efeito negativo do sorbato de potássio sobre o *M. bovis* e o fato de que a natamicina, também autorizada no regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos (BRASIL, 1996), ter sido encontrada no comércio, optou-se por testá-la.

Material e Métodos

Foi utilizada cultura de *Mycobacterium bovis* - espoligotipo SB1033 (ROSALES, 2005) com 15 dias de cultivo em garrafas com meio de Stonebrink-Leslie, cedidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O inóculo foi preparado conforme procedimento descrito no item 3.2. e foi submetido à diluição decimal seriada até $10^{-3}$, usando como diluente a solução peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização vigorosa em vórtex por 10 segundos, 0,1µL de cada diluição foi semeado, empregando micropipetas estéreis, em garrafas contendo meio Stonebrink-Leslie, que foram incubadas por 45 dias em estufa a 36°C.

O meio de cultura Stonebrink-Leslie foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANA DE ZOONOSIS, 1985). Foram separadas quatro porções de 120mL de meio de cultura, a primeira foi reservada como controle, nas outras três foram adicionados 0,1%, 0,01% e 0,001% de Natamax® respectivamente.

Resultados

Ocorreu o crescimento de colônias em todos os meios de cultura adicionado de natamicina e também no controle. O resultado da contagem foi “incontável” em todas as diluições realizadas ($10^0$ a $10^{-3}$), mas o crescimento foi aparentemente igual em todos os meios para uma mesma diluição.

Conclusão

O uso de natamicina no meio de cultura não interferiu na sobrevivência e no crescimento do *Mycobacterium bovis.* Assim, optou-se por empregá-lo como fungicida aplicado na forma de banho ao término da fabricação do queijo e após cada coleta de amostra.