UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMILA DINIZ FONTANESI

**Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão
fabricado com leite experimentalmente contaminado**

São Paulo
2012

CAMILA DINIZ FONTANESI

Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado.

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

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Área de Concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador:
Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

São Paulo
2012

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.2582
FMVZ

Fontanesi, Camila Diniz
Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado / Camila Diniz Fontanesi. -- 2012.
65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Parmesão. 2. Cura do Queijo. 3. *Brucella abortus*. 4. Decaimento. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado”, protocolado sob o nº 2033/2010, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise de 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 29/09/2010.

We certify that the Research “Viability of *Brucella abortus* during the ripening of parmesan type cheese made from experimentally contaminated milk”, protocol number 2033/2010, under the responsibility Profa. Dra. Evelise de 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 09/29/2010.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FONTANESI, Camila Diniz

Título: Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e 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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dagoberto e Neli

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dagoberto e Neli Fontanesi, por desejarem e fazerem sempre o melhor por mim.

Aos meus irmãos, Fabiane Campedeli e Flávio Fontanesi, e ao meu cunhado, Delfo Campedeli, pela compreensão, incentivo, torcida e apoio.

A Vanessa Salgado e Karina Starikoff pela paciência, boa vontade em ensinar e aconselhar.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Higiene Alimentar Camila Noia, Daniele Raimundo, Fernanda Arellano, Marcela Peterson e Patrícia Moriconi pelos momentos de descontração, incentivo e auxílio. Sem vocês o projeto não seria possível.

A Sandra Sanches, Gisele de Souza e Zenaide de Moraes pela amizade e ajuda em todas as etapas do projeto. Em especial a Sandra pelo carinho e incentivo demonstrados desde a minha graduação.

A Professora Evelise por me orientar não somente na dissertação, mas em toda a minha carreira, seu apoio foi o que me permitiu chegar até aqui e foi fundamental para o meu crescimento profissional. Obrigada pela compreensão, confiança, carinho e amizade.

Ao Professor Fernando pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Leandro Camillo e a Camila Baltazar pela compreensão, suporte e amizade, no ambiente de trabalho e na minha vida.

Aos amigos Bruna Ibiapina, Cecília Augusto, Fábio Sousa, Juliana Mecca, Juliana Nogueira, Marianne Rovea, Melanie Gutjahr, Mirna Alves, Ricardo Cabral, Sandro Jardim e Priscila Delgado pelo incentivo e ombro amigo, sei que sempre posso contar com vocês.

A Deus por me propiciar pessoas e caminhos que me trouxeram até onde estou.

RESUMO

FONTANESI, C.D. Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado. [Viability of *Brucella abortus* during the ripening of parmesan type cheese made from experimentally contaminated milk]. 2012. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A legislação brasileira permite o uso de leite cru na fabricação de queijos curados se o período de cura for superior a 60 dias (a 5°C ou mais). Entretanto, não há evidência científica sólida de que durante a cura ocorre suficiente inativação de *Brucella abortus*, sob a perspectiva da segurança dos alimentos. Além disso, não há metodologia oficial para quantificação de brucelas em matriz alimentar. Desta forma este projeto propõe um protocolo para estudos da curva de decaimento de *Brucella abortus* durante a cura de queijos. Três partidas de queijo tipo parmesão foram feitas com leite tipo A pasteurizado, artificialmente contaminado com uma cepa pouco patogênica de *Brucella abortus* (1119-3). O queijo foi curado a 18°C e analisado a cada 3-4 dias até o 60º dia ou até que duas análises consecutivas fossem negativas. As amostras foram submetidas à pesquisa quantitativa de brucela em meio Farrel (36°C/3 dias). A média do Tempo de Redução Decimal ($D_{18^{\circ}\text{C}}$), ponderado pelas incertezas, foi de $4,31 \pm 0,49$ dias. Estes resultados são preliminares e é necessário realizar mais análises para gerar dados mais precisos sobre esse parâmetro, especialmente usando cepas de campo. O Tempo de Redução Decimal associado à cura do queijo é um parâmetro importante para os modelos de avaliação de risco da transmissão de brucelose pelo consumo de queijo.

Palavras-chave: Parmesão. Cura do queijo. *Brucella abortus*. Decaimento.

ABSTRACT

FONTANESI, C.D. Viability of *Brucella abortus* during the ripening of parmesan type cheese made from experimentally contaminated milk. [Viabilidade da *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado]. 2012 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Brazilian legislation allows the use of raw milk to produce ripened cheeses, when the ripening period is over 60 days (at 5°C or above). However, there is not solid scientific evidence that the ripening process inactivates enough amounts of *Brucella abortus*, from the food safety perspective. In addition, there is no official methodology for brucella counting in food matrix. So, this project proposes a protocol to study the decay curve of *Brucella abortus* during cheese ripening. Three batches of parmesan type cheese were made with pasteurized milk artificially contaminated with a less pathogenic strain of *Brucella abortus* (1119-3). The cheese was ripened at 18°C and analyzed each 3-4 days until 60th or until two consecutive negative results. The samples were submitted to quantitative culture for brucella in Farrel medium (36°C/3 days). The average of Decimal Reduction Time ($D_{18^{\circ}\text{C}}$), weighted by uncertainties, was $4,31 \pm 0,49$ days. This is a preliminary result and we need to run more samples to generate more accurate data about this parameter, specially using field strains. The Decimal Reduction Time associated with ripening step is an important data to input risk assessment models for cheese-born brucellosis.

Key words: Parmesan type cheese. Cheese ripening. *Brucella abortus*. Decay.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 1 - São Paulo – out 2011-jan 2012.....40
- Gráfico 2 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 2 - São Paulo – out 2011-jan 2012.....40
- Gráfico 3 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 3 - São Paulo – out 2011-jan 2012.....41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de Gráfico semi-logarítmico para o cálculo do Valor D..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção total de leite sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000-2011	24
Tabela 2 - Resultados das contagens (log UFC/g) de <i>Brucella abortus</i> 1119-3 no leite e no queijo tipo parmesão durante a cura a 18°C – São Paulo – out 2011-jan 2012	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramma
kg	Quiilograma
log	Logaritmo
<i>L. monocitogenes</i>	<i>Listeria monocitogenes</i>
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NY	Nova York
OIE	The World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em cadeia Polimerase
U	Unidade

UFC	Unidades formadoras de colônias
UHT	Ultra High Temperature
USP	Universidade de São Paulo
v/v	Volume por volume
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CO ₂	Gás carbônico
<	Menor
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Cultura empregada.....	33
3.2	Preparação do Inoculo.....	34
3.3	Contaminação do Leite e Fabricação do Queijo.....	34
3.4	Medidas de Biossegurança.....	36
3.5	Coleta e Análise Quantitativa.....	36
3.6	Contagem de Colônias e Registro de Resultados.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	47
	APÊNDICES.....	53

1 INTRODUÇÃO

Brucelose é uma zoonose que pode ser transmitida através do leite (e derivados) de animais infectados pela bactéria *Brucella* spp., cuja espécie de maior importância para o rebanho bovino é a *Brucella abortus* (OIE, 2009).

A brucelose bovina está disseminada globalmente, com exceção de vários países do centro e norte da Europa, Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia que são considerados livres do agente (OIE, 2009). No Brasil, o agente parece estar presente em todas as regiões, em maior ou menor prevalência e, segundo dados recentes, a prevalência de animais infectados nos Estados que concentram a maior produção de leite é de 1,1% em Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2009), 1,0% no Rio Grande do Sul (MARVULO et al., 2009) e 1,7% no Paraná (DIAS et al., 2009). Os mesmos autores observaram que a prevalência de focos infectados nesses Estados é de 6,0%, 2,1% e 4%, respectivamente. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agrária (EMBRAPA, 2012a), a produção de leite nesses Estados soma 15.617.648 mil litros (50,85% da produção nacional) em 2010; o volume de produção de Minas Gerais foi de 8.388.039 mil litros, Rio Grande do Sul, de 3.633.834 mil litros e Paraná produziu 3.595.775 mil litros. O Estado de São Paulo foi o sexto maior produtor de leite em 2010, com volume de produção de 1.605.657 mil litros.

A pasteurização do leite é um método efetivo para o controle da transmissão da doença ao homem (FAO/WHO, 1986) e é obrigatória no Brasil (BRASIL, 1952), exceto para fabricação de queijos com período de maturação maior que 60 dias (BRASIL, 1996). A legislação do estado de São Paulo permite o emprego do leite cru em queijos com período de maturação maior que 90 dias (SÃO PAULO, 1994).

No entanto, não há embasamento científico sólido sobre a curva de morte da *Brucella* spp. durante a maturação de queijos e, segundo a FAO/WHO (1986), pode-se levar alguns meses até que queijos fermentados e duros possam ser considerados seguros.

Torna-se necessária, portanto, uma avaliação sobre o tempo de redução decimal da *Brucella abortus* em queijos curados e, assim, contribuir para futuras avaliações de risco relacionadas à presença do agente nesse alimento.

A aplicação da Análise de Risco na segurança alimentar poderá contribuir para o melhor uso das informações científicas sobre o risco de doenças transmitidas por alimentos, poderá ainda auxiliar o processo de tomada de decisão para mitigação do risco na cadeia produtiva, incluindo a melhor alternativa para alocação de recursos, e auxiliando inclusive na comunicação entre as partes envolvidas, inclusive com o consumidor (HUBBERT et al., 1996).

Desta forma, este projeto teve o objetivo de estudar o decaimento da população de *Brucella abortus* durante a cura a 18°C de queijo parmesão, fabricado com leite experimentalmente contaminado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O leite destinado ao consumo “in natura”, 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 (BRASIL, 1952). Exceção é feita ao leite destinado à fabricação de queijos com maturação acima de 60 dias, segundo a normativa federal (BRASIL, 1996), enquanto o Estado de São Paulo exige maturação mínima de 90 dias para fabricação de queijo com leite cru (SÃO PAULO, 1994).

Contudo, apenas 67% do total de leite produzido no país em 2011 foram controlados pelos serviços oficiais de inspeção, conforme dados divulgados pela EMBRAPA (2012b) e apresentados na tabela 1. Desta parcela, aproximadamente 33% são comercializados na forma fluída (leite pasteurizado e longa vida), 18% são transformados em pó, 34 % em queijos, 7% em leites fermentados, 5% em leite condensado e 3% em outros produtos lácteos (EMBRAPA, 2008).

Os outros 33% do leite produzido no País, que não é inspecionado, são consumidos pelo mercado informal. A fabricação de queijos é uma importante alternativa de uso desse leite, por agregar valor e aumentar a renda do produtor, no entanto, esses produtos são fabricados sem controle higiênico-sanitário e, provavelmente, a partir de leite cru.

Queijos frescos fabricados com leite cru mantêm as bactérias preexistentes, incluindo eventuais agentes patogênicos (RIEDEL, 2005). O número de brucelas, eventualmente presente no queijo, se reduz gradualmente durante a maturação, mas, até que o produto se torne seguro podem ser necessários alguns meses de cura (FAO/WHO, 1986).

Tabela 1 - Produção total de leite sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000-2011

Ano	Produção total	Leite inspecionado	Dif % 2010/2009
	(mil litros)	(mil litros)	
2000	19.767.206	12.107.741	61,3
2001	20.509.953	13.212.445	64,4
2002	21.642.780	13.221.307	61,1
2003	22.253.863	13.627.205	61,2
2004	23.474.694	14.495.145	61,7
2005	24.620.859	16.284.267	66,1
2006	25.398.219	16.669.742	65,6
2007	26.137.266	17.888.643	68,4
2008	27.579.383	19.285.077	69,9
2009	29.105.495	19.601.655	67,3
2010	30.715.460	20.975.501	68,3
2011 ⁽¹⁾	32.296.120	21.594.502	66,9

⁽¹⁾ 2011 Estimativa

Fonte: Embrapa Gado de Leite

Deve-se ter em mente que a presença de gordura em um alimento aumenta a resistência de alguns microrganismos ao calor, presume-se que seja devido ao fato de a gordura afetar o conteúdo de água da célula, e seria lícito imaginar que também altera a resistência a outras condições adversas. Mudanças no substrato, bem como na microbiota competitiva, também podem influenciar a sobrevivência de um microrganismo (LANDGRAF, 1996).

Estudos sobre a presença/sobrevivência da bactéria *Brucella* em alimentos tem sido realizados em diferentes países ao longo dos anos, com resultados variados, inclusive porque não há uma metodologia padronizada para pesquisa desse agente em alimentos.

Carpenter et al. (1928) inocularam 2 cepas de *Brucella abortus* (5532 e 5549) no creme de leite, o armazenaram a 8°C e observaram, através de inoculação em cobaias, que as cepas permaneceram viáveis por 8 dias. A inoculação de outras duas cepas (1 bovina: 80, e outra isolada de sangue humano: H-1), mais patogênicas para as cobaias, permaneceram viáveis por 10 dias. Em uma segunda etapa, as quatro cepas de *Brucella* foram inoculadas em manteiga e armazenadas na mesma temperatura, observando-se viabilidade por 81 dias (5532), 32 dias (5549) e 142 (80 e H-1). Testaram ainda 82 amostras de queijo (maioria importados) e 17

amostras de manteiga do comércio varejista, que não demonstraram sinais de infecção por *Brucella abortus* ou *Brucella melitensis* nos animais.

Gilman et al. (1946) realizaram uma pesquisa aprofundada em queijos Cheddar e Limburguer para averiguar a sobrevivência e presença de *Brucella abortus* no estado de Nova York e Wisconsin, a partir de inoculação em cobaias. O projeto foi dividido em quatro partes. Primeiro foram coletadas 15 amostras de leite de 11 fábricas diferentes de queijo cheddar em NY, que não mostraram a presença de *Brucella abortus*. No segundo experimento, 10 amostras de leite de 10 estabelecimentos que fabricam Limburguer no estado de NY foram analisadas: 8 dessas eram negativas e 2 continham quantidade suficiente do organismo para causar infecção nas cobaias. As coalhadas de 24 horas e os queijos com 57 dias de armazenamento, feitos a partir das duas amostras de leite positivas, não mostraram sinais do agente nas cobaias inoculadas. Na terceira parte foi realizada uma tentativa de determinar a viabilidade do agente em queijos cheddar, fabricados em laboratório a partir de leite proveniente de vacas conhecidamente infectadas (aproximadamente 500 brucelas por ml de leite). A esta amostra foram adicionadas cepas de *Brucella abortus* viáveis até totalizarem uma contaminação de 1000 brucelas por ml de leite (não há relato no trabalho do método para a quantificação do agente). Foi observado que o agente era viável no leite cru, no leite acrescido de *Brucella abortus*, na coalhada fresca, no queijo armazenado por uma semana, duas semanas, um mês e três meses. Aos seis meses, todas as cobaias estavam positivas, mas as lesões eram pequenas atestando, segundo os autores, que receberam comparativamente menor carga infectante, e um ano depois todas as cobaias foram negativas. Na quarta etapa foram coletadas amostras de leite sabidamente contaminadas com *Brucella abortus* (700-800 brucelas por ml de leite, o trabalho não descreve como o agente foi quantificado), sem o acréscimo de mais cepas. Os organismos foram viáveis no leite cru, na coalhada fresca e nos queijos armazenados até 1 mês; no terceiro mês todas as cobaias foram positivas, mas as lesões eram pequenas; no sexto mês, cinco cobaias foram negativas e três positivas com lesões fracas; após um ano todas as cobaias resultaram negativas para a infecção.

Um estudo sobre a presença e sobrevivência da *Brucella abortus* em coalhada de queijo Italiano, feito a partir de leite pasteurizado e não pasteurizado, demonstrou a presença do agente em 5 de 6 coalhadas feitas a partir de leite cru e também recuperou o agente em 3 de 4 amostras de leite cru. A adequada pasteurização do leite acarretou em não recuperação do agente nas

amostras de leite e da coalhada feita com esse leite. O método de análise foi inoculação em cobaias (GILMAN et al., 1952).

Um trabalho realizado por Plommet et al. (1988) avaliou a sobrevivência de *Brucella abortus* (cepa de referência 544) em queijos moles fabricados a partir de leite de vacas infectadas experimentalmente na França. Fizeram 3 lotes de queijo tipo Camembert que foram armazenados a 12°C, em ambiente com alta umidade, por 35 a 40 dias. A enumeração da brucela foi feita a partir do plaqueamento em meio seletivo (WE médium) incubado por pelo menos 8 dias com atmosfera adicionada de 10% de CO₂. Inicialmente, a brucela do leite ficou concentrada na coalhada e as contagens permaneceram altas por 20 horas, em seguida, a contagem foi decrescendo de acordo com a queda de pH, sendo que com 18 dias de maturação nenhuma *B. abortus* foi detectada. As amostras com 20-25 dias de maturação foram fornecidas a camundongos por via oral e não houve manifestação de nenhum sinal clínico de infecção e tampouco a brucela foi isolada a partir dos animais necropsiados. Após esses resultados negativos, os queijos remanescentes (com 40 dias de armazenamento) foram ingeridos pelos autores e equipe técnica, sendo que alguns deles nunca haviam tido contato com *Brucella*, sem que tenha sido detectado nenhum problema de saúde (decorrente da ingestão) pelo Programa Oficial de Vigilância da Brucelose Médica.

Os mesmos autores citam estudo realizado por Verger (1971). Este relata teste realizado no qual a administração intragástrica de uma dose de 500 UFC de *Brucella melitensis* demonstrou induzir infecção em 50% dos camundongos inoculados e, no caso de 16 UFC administradas, 1 em cada 10 camundongos apresentaram infecção.

No período de 1998-1999, foi realizado um estudo com queijo Minas Frescal inspecionado e não inspecionado, no estado do Rio de Janeiro. Nascimento et al. (2002) tentaram isolar *Brucella abortus* através de cultivo microbiológico em ágar Brucella com adição de antimicrobianos, ágar Nutriente e ágar Triptose (todos incubados a 37°C/72 a 96 horas, em atmosfera com redução de oxigênio), mas o agente não foi detectado em nenhuma das amostras.

Estudo realizado por Langoni et al. (2000) avaliou o isolamento de *Brucella* spp em leite de vacas (sorologicamente positivas para brucelose) dos estados de São Paulo e Minas Gerais a partir de três métodos diferentes (inoculação intraperitoneal em cobaia, semeadura em meio

de Farrel e também em Brodie-Sinton seguido de cultivo em ágar-Brucella). O cultivo do agente se deu em temperatura de 37°C/7 dias em aerofilia (10% CO₂). Observaram que o isolamento foi possível em 15 de 49 amostras (30,61%), e que a semeadura em meio Farrel foi o método que obteve maior taxa de isolamento.

Em pesquisa realizada na Itália, Tantillo et al. (2001) compararam os métodos de detecção de *Brucella melitensis* pelo cultivo microbiológico e PCR. Testaram os métodos em cultivo do agente em leite e queijo artificialmente contaminados. A concentração microbiológica da cepa usada foi de 3×10^{10} UFC/ml no cultivo, o método microbiológico convencional detectou 30 UFC enquanto o PCR conseguiu detectar o agente quando este se apresentava em menor quantidade (inferior a 10 UFC). Os mesmos resultados foram obtidos no leite contaminado e no queijo, o PCR foi positivo à diluição de 10^{-7} (correspondendo a 10^2 UFC).

Em estudo realizado no Brasil, avaliando as técnicas de reação de polimerase em cadeia (PCR) e cultivo microbiológico, para detecção de *Brucella* spp. em 192 amostras de queijos (Minas frescal e meia cura) ilegais provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais, Miyashiro et al. (2007) não conseguiram isolar o microrganismo de nenhuma das amostras submetidas à cultura, em contra partida a técnica de PCR demonstrou a presença do DNA do agente em 19,27% das amostras, que posteriormente foram comprovadas como sendo *Brucella abortus*.

A eficiência de detecção de *Brucella* spp. pela técnica microbiológica convencional depende das amostras possuírem agentes viáveis, da qualidade da amostra e do tempo entre a coleta e análise da amostra. A PCR possui maior eficiência de detecção, mas não consegue distinguir entre os agentes viáveis e não viáveis (TANTILLO et al., 2001; MIYASHIRO et al., 2006).

Em pesquisa realizada no México, Estrada et al. (2005), utilizaram leites estéreis com baixo teor de gordura inoculados com cultura iniciadora de iogurte e duas concentrações (10^5 e 10^8 UFC/ml) de *Brucella abortus*, para verificar a viabilidade das mesmas. Observaram que, após 10 dias de armazenamento a 4°C, ainda havia 10^5 UFC/ml de *Brucella abortus* viáveis no leite fermentado de maior contaminação, apesar do baixo pH (pH<4). Não foram observadas colônias após 23 dias de armazenamento.

Zaffari et al. (2007) estudaram queijos artesanais (Colonial, Provolone, Ricota e Caccio Cavallo) comercializados em beiras de estradas na região do Rio Grande do Sul, buscando a qualidade bacteriológica. Não foi possível isolar *Brucella* spp, a partir do cultivo em caldo e ágar *Brucella* (37°C, em microaerofilia), em nenhuma das amostras pesquisadas.

Falenski et al. (2011), realizaram um trabalho na Alemanha visando observar a sobrevivência de *Brucella* spp. em água mineral, leite UHT, leite cru, leite cru certificado (possui menor contagem de bactérias totais e células somáticas que o leite cru comum) e iogurte com diferentes concentrações de gordura, contaminados em laboratório com 5×10^7 UFC/ml do agente, sobre condições normais de estocagem. Após 63 dias não foram detectadas colônias na água mineral, no leite UHT havia $6,7 \times 10^8$ UFC/ml de *Brucella abortus* após 87 dias de armazenamento, ambos os leites crus apresentaram decaimento atingindo aproximadamente 2×10^7 UFC/ml em 4 dias (não houve divergência significativa entre os dois tipos de leite) e não foram detectadas bactérias viáveis nos iogurtes após 2 dias (10% de gordura), 3 dias (1,5% de gordura) e 5 dias (3,5% de gordura) de estoque.

Devido à ocorrência de surtos de doenças associadas ao consumo de leite e derivados lácteos não pasteurizados, a Food and Drug Administration – FDA (2011), o Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2011a, 2011b) e o FoodSafety.gov (2011) publicaram advertências e revisões esclarecendo o risco que o consumo desses produtos traz a saúde, principalmente de recém-nascidos, crianças, idosos, mulheres grávidas e pessoas imunodeprimidas. Segundo a FDA (2007) a pasteurização do leite também é necessária para produtos lácteos, com exceção dos queijos maturados.

Atualmente, no Brasil, produtores de queijos artesanais solicitam a redução do período de maturação para queijos produzidos a partir de leite cru. Visando estabelecer critérios para esses queijos artesanais, foi publicada a Instrução Normativa n. 57 de 15 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011) que resolve:

permitir que queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.

A legislação estabelece ainda que o tempo de maturação será definido por ato normativo específico, após a avaliação de estudos realizados por comitê técnico-científico designado pelo MAPA.

Estudos a respeito da sobrevivência de outros microrganismos patogênicos em leite e derivados também foram pesquisados por outros autores.

Yousef e Marth (1990) fabricaram queijos do tipo parmesão a partir de leite contaminado com 10^4 a 10^5 UFC/ml de *L. monocytogenes* para observar a presença do agente durante a maturação do queijo, mas não o detectaram após 2 semanas de maturação.

A sobrevivência de *Listeria monocytogenes* foi pesquisada por Cataldo et al. (2007), através da inoculação do agente em queijos moles italianos (muçarela, crescenza, gorgonzola e ricota). Os autores observaram a presença do agente mesmo após 15 dias de armazenamento.

Belessi et al. (2008), analisaram a sobrevivência de *Listeria innocua* com e sem a inoculação de fungos durante o armazenamento de queijo Feta e iogurte, em 3 a 15°C. Observaram que o agente sobreviveu melhor no queijo que no iogurte em todas as temperaturas e que o crescimento de fungo no queijo Feta e iogurte favoreceram a sobrevivência bacteriana.

A perda da viabilidade de *L. monocytogenes* em queijos processados contaminados durante o armazenamento em 4, 12 e 22°C foi observada por Angelidis, Boutsiouki e Papageorgiou (2010). Foi relatado que houve detecção do agente por mais de nove meses pós-inoculação em queijos com carga inicial de 6×10^5 UFC/g, armazenados a 4°C.

Visando compreender e analisar os fatores que influenciam a destruição térmica dos microrganismos, convencionou-se a utilização dos resultados em torno de um parâmetro, o valor “D”, que indica o período de tempo necessário para reduzir o número de microrganismos a um décimo do seu valor inicial, em uma temperatura específica (JAY, 2000).

Uma população de um microrganismo submetida a um estresse térmico, em determinado ambiente, sofre uma redução exponencial em relação ao período de exposição a esse estresse. Esse comportamento normalmente é representado pela variação da população em um gráfico semi-logarítmico, onde na ordenada (eixo y) são encontrados valores que indicam o número de microrganismos sobreviventes e na abscissa (eixo x) o período de tempo de tratamento térmico decorrido. No gráfico resultante é identificada a distribuição de valores que

apresentam o maior coeficiente de correlação com uma reta e, a partir desta, é selecionada a redução de um ciclo logarítmico dos microrganismos sobreviventes (em log), sendo projetada ao eixo referente ao tempo para encontrar o valor D (Figura 1). Esse valor numérico é de alta relevância para a análise de risco, por possibilitar o cálculo do nível de segurança conferido ao produto submetido a um processamento térmico (JAY, 2000).

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

Starikoff (2011) avaliou a inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo parmesão fabricado a partir de leite artificialmente contaminado, mantido a 18°C. O autor encontrou valor $D_{18^{\circ}\text{C}}$ médio, ponderado pelas incertezas de 37,5 dias $\pm$ 5,3 dias e detectou o agente durante e após 60 dias de cura.

A abordagem tradicional de inocuidade dos alimentos baseado num sistema reativo, de responsabilidade governamental, calcado na análise laboratorial de produto final mostra-se ineficaz por várias razões, entre elas, porque os microrganismos não se distribuem de forma homogênea nos alimentos, porque normalmente estão presentes em pequeno número (quanto menor o grau de contaminação, menor as chances de se detectar uma amostra positiva e, portanto, maior a probabilidade de se aprovar um lote não-conforme) e devido ao alto custo (econômico e ambiental) de se condenar lotes de alimentos após todo o esforço de produção.

Assim, a recomendação dos órgãos internacionais é que se trabalhe sob um conceito de proatividade, prevenção, responsabilidade compartilhada, integração, controle de processo de produção e análise de risco.

A Análise de Risco identifica um potencial perigo à saúde, associado a um alimento, avalia a exposição (probabilidade da sua ocorrência considerando a contaminação inicial e modulando o aumento ou diminuição em toda a cadeia produtiva incluindo o preparo/consumo), estima o impacto e sugere medidas para solucioná-lo. A Avaliação do Risco é o componente científico central da Análise de Risco, e faz a *“caracterização qualitativa e/ou quantitativa e a estimativa do potencial do efeito adverso à saúde associado à exposição de indivíduos ou de uma população a um perigo”* (OPAS/OMS, 2008).

Vale ainda ressaltar que a legislação brasileira, tanto do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), quanto à do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), não estabelecem critério microbiológico para *Brucella abortus* ou mesmo para o gênero, provavelmente porque a pasteurização é obrigatória, e, referente ao queijo curado, ela não considera a possibilidade de sobrevivência do agente.

Todos esses fatos enfatizam a importância de estudos sobre a viabilidade da *Brucella abortus* em substratos lácteos para a análise da segurança conferida pela maturação de queijo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para definir a metodologia que melhor se adequaria ao nosso objetivo, foram necessários alguns estudos pilotos para estabelecer dois importantes parâmetros do estudo: 1) o meio de cultura – definir uma formulação que fosse impediante para a microbiota natural do queijo, mas que não afetasse o crescimento da *Brucella abortus* para possibilitar o emprego de uma técnica de quantificação; 2) o protocolo de contaminação do leite - para se obtivesse uma carga inicial alta de *Brucella* sp. no queijo. Esses estudos estão descritos mais adiante, nos Apêndices A, B, C, D e E.

Uma vez definidos esses parâmetros, foram fabricadas três partidas de queijo do tipo parmesão, a partir de leite pasteurizado tipo A artificialmente contaminado com *Brucella abortus* 1119-3, gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Spacagna Jordão, do Instituto Biológico de São Paulo.

3.1 Cultura empregada

Brucella abortus 1119-3, variante do biovar 1, liofilizada, foi ressuspendida em 3 ml de água milli-Q autoclavada. Após homogeneização, 100 µl foram semeados em ágar triptose, em triplicata, e incubados a 36°C por 03 dias. Após esse período observou-se no ágar o crescimento de colônias com características macroscópicas compatíveis com *Brucella abortus*. As colônias foram então submetidas às provas de gram e bioquímicas para avaliar a compatibilidade com a espécie e biovar empregados (ALTON et al., 1975). Comprovado o agente, foi feita nova semeadura, com o auxílio de uma alça descartável em ágar triptose, em duplicata, e incubados a 36°C por 03 dias. Essa cultura foi utilizada para preparar o inóculo.

3.2 Preparação do Inóculo

A cultura de *Brucella abortus* foi ressuspensa em solução salina 0,8% estéril até se obter turbidez equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland que, segundo Harrigan (1998) corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/ml. Como foram necessários 48 ml de inóculo para contaminar o volume total de leite a ser empregado na fabricação, o inóculo foi preparado em quatro tubos contendo 10 ml e um tubo contendo 8 ml de solução salina, de forma a favorecer a comparação de turbidez com a da escala.

3.3 Contaminação do Leite e Fabricação do Queijo

Utilizou-se 12 litros de leite integral pasteurizado do tipo A, de uma única marca, provenientes do comércio varejista. O leite foi despejado lentamente em recipiente estéril de alumínio e homogeneizado com espátula de inox estéril, e em seguida foi contaminado com 48 ml inóculo recém-preparado e novamente homogeneizado. Esse recipiente estava em banho-maria num outro maior e havia dois termômetros, um na água e outro no leite, para que se pudesse acompanhar a temperatura durante a fabricação. Utilizou-se um fogão para que se conseguissem as temperaturas necessárias à fabricação.

O leite já contaminado foi aquecido até atingir temperatura aproximada de 32 a 35°C, quando uma amostra de 9 ml foi retirada para quantificação do agente. A partir de então, controlou-se a temperatura do leite e da água para que não excedesse nem reduzisse desse intervalo de temperatura.

Neste momento, foram adicionados ao leite 12 ml do fermento TCC- 20 (Thermophilic Culture Blend Freeze-dried Lactic Culture for Direct Vat Set - DVS, Chr. Hansen®), que havia sido previamente preparado. O conteúdo de um sachê do fermento em pó havia sido adicionado a 500 ml de leite UHT integral esterilizado, homogeneizado em liquidificador estéril, fracionado em porções de 12 ml em recipientes estéreis e congelado em freezer doméstico. Imediatamente antes do uso o fermento era descongelado em temperatura ambiente e adicionado ao leite já contaminado, conforme descrito anteriormente.

Após 30 minutos da adição do fermento, foram adicionados 6 ml de cloreto de cálcio, 6 ml de nitrato de sódio, 2,4 ml de ácido láctico (diluído em 240 ml de água destilada) e 3 ml de coagulante (diluído em 60ml de água destilada); na ordem descrita. A mistura foi homogeneizada por 2 minutos e deixada por 30 minutos em descanso para que houvesse a coagulação (formação da coalhada).

Logo após, a coalhada foi cortada com faca estéril, vertical e horizontalmente, até atingir o tamanho aproximado de “um grão de arroz”. Em seguida a massa foi homogeneizada suavemente durante o aquecimento até 44°C, o que levou cerca de 20 minutos, e vigorosamente até atingir 50°C, mais 40 minutos aproximadamente.

Neste momento, a coalhada foi transferida, com auxílio de coador e espátula, para a forma provida de dessorador que foi acomodada em recipiente de inox. Colocou-se sobre o queijo um peso de 5 kg, para auxiliar a dessoragem, e o recipiente foi fechado e mantido em estufa a 18°C por 24 horas.

Após a prensagem foi feita a salga com solução salina a 20% esterilizada, por duas horas. Nesse momento foi retirada a primeira amostra de queijo para análise. No queijo restante foi realizado um banho com solução aquosa a 0,075% de natamicina, para evitar crescimento de fungos na superfície do queijo (BRASIL, 1996). A seguir o queijo foi transferido para um recipiente de vidro que foi fechado com outro, invertido, e a junção dos vidros foi fechada com parafilme. O queijo foi mantido em refrigerador a 18°C para secagem e maturação.

Os queijos foram tombados diariamente nos primeiros três dias e, após esse período, duas vezes por semana, nos dias de coleta para análise. As coletas foram realizadas até atingir duas análises consecutivas com ausência de crescimento.

Toda a manipulação do queijo após a fabricação foi realizada dentro de fluxo laminar.

3.4 Medidas de Biossegurança

Duas pessoas ficaram responsáveis pela fabricação dos queijos. Não houve fluxo de pessoas no laboratório até a finalização do processo. Os presentes utilizaram os seguintes equipamentos de proteção individual (EPI): avental de mangas compridas com o fechamento atrás, touca, luvas de borracha e máscara *Descarpac*® (Máscaras de proteção N95), todos descartáveis, além de calças compridas, avental de algodão sob o avental descartável, óculos de proteção e botas de borracha.

Todos os utensílios utilizados durante a fabricação e os resíduos de soro e queijo sofreram primeiro uma desinfecção química e, posteriormente, física. Os materiais de alumínio foram desinfetados com solução de formol (1:10 v/v) e os demais, com água sanitária (1:2 v/v).

Todo o material, tanto os utensílios e resíduos, quanto os EPIs (exceto a bota), foi embalado em saco plástico autoclavável e permaneceu fechado no laboratório, para a desinfecção ambiental, *overnight*, usando a fumigação com permanganato de potássio (adicionado de formol). As botas foram deixadas sobre pano descartável encharcado com água sanitária. No dia seguinte, todo o material foi autoclavado a 121°C/30min., com exceção das botas que foram lavadas com solução de formol 50%.

Em todos os procedimentos de manipulação do queijo foram utilizados óculos de proteção, avental de mangas longas, máscara, gorro e luvas de látex descartáveis. Ao final de cada um desses procedimentos esses EPI foram acondicionados em sacos plásticos e autoclavados a 121°C/30min., assim como as placas de petri descartáveis (após cada leitura).

3.5 Coleta e Análise Quantitativa

Foram analisados o leite recém-contaminado e o queijo nos seguintes dias de maturação: 1°, 4°, 8°, 11°, 15°, 18°, 22°, 25°, 29°, 32°, 35°, 39°, 43°, 46°, 50°, 53°, 57° e 60° ou até que duas análises consecutivas apresentassem ausência de crescimento em todas as diluições.

Em cada coleta foram retirados 25 g de queijo com pinça e faca. A amostra foi colocada em saco plástico para stomacher, onde foi adicionado 225 ml de caldo triptose, e homogeneizada em stomacher da marca comercial Laboratory Blender STOMACHER® 400, em velocidade normal por 60 segundos. A partir desta diluição (10^{-1}) foi feita a diluição decimal seriada até 10^{-5} em caldo triptose. Cem μ l de cada diluição foram semeados em meio Farrel, em duplicata, e as placas incubadas por 3 dias em estufa a 36°C.

3.6 Contagem de Colônias e Registro de Resultados

Utilizou-se a diluição que apresentou entre 10 e 150 colônias em cada placa. Fez-se a média aritmética das unidades formadoras de colônias (UFC) das duas placas, multiplicou-se o resultado pelo inverso da diluição e pelo fator de correção da alíquota semeada (0,1 ml). O resultado foi expresso em log UFC/ml ou g.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas três partidas de queijo fabricadas observou-se que a *Brucella abortus* 1119-3 não apresentou crescimento em meio Farrel após 25 dias de cura, indicando que a contaminação, se presente, encontrava-se abaixo do limite da técnica (50 UFC/g). Os resultados das contagens podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das contagens (log UFC/g) de *Brucella abortus* 1119-3 no leite e no queijo tipo parmesão durante a cura a 18°C – São Paulo – out 2011-jan 2012

amostra	Queijo 1 (log UFC/ml ou g)	Queijo 2 (log UFC/ml ou g)	Queijo 3 (log UFC/ml ou g)	Média (log UFC/ml ou g)
leite	6,2	5,8	5,5	5,8
dia 1	5,7	5,8	4,8	5,4
dia 4	5,4	6,0	4,6	5,3
dia 8	3,9	4,0	3,9	3,9
dia 11	4,3	4,8	3,0	4,0
dia 15	4,8	2,5	0,0	2,4
dia 18	4,1	2,5	1,7	2,8
dia 22	4,0	0,0	0,0	1,3
dia 25	2,2	0,0	1,7	1,3
dia 29	0,0	*	0,0	0,0
dia 32	0,0	*	0,0	0,0
média	3,7	3,5	2,3	2,9
desv. Pad.	2,11	2,56	2,15	2,13
mediana	4,1	4,0	1,7	2,8
min.	0,0	0,0	0,0	0,0
max.	6,2	6,0	5,5	5,8

* análises não realizadas porque houve 2 resultados consecutivos negativos, expressos como 0,0 (que indica contagem inferior ao limite de detecção da técnica, ou seja, <50 UFC/g).

Observa-se que a contaminação do leite é semelhante à do queijo recém-fabricado, apesar da “perda” de células bacterianas que saem no soro. Por outro lado, há uma concentração de sólidos e com isso, a concentração bacteriana no queijo se mantém em nível aproximadamente igual à do leite.

A curva de sobrevivente (e sua equação da reta) para *Brucella abortus* obtidas a partir das contagens de cada queijo durante o período de maturação a 18°C está representada graficamente a seguir (Gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 1 - São Paulo – out 2011- jan 2012

Gráfico 2 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 2 - São Paulo – out 2011- jan 2012

Gráfico 3 – Curva de sobrevivência de *Brucella abortus* 1119-3 obtida a partir da contagem (log UFC/g) do agente durante o período de maturação a 18°C do queijo tipo parmesão 3 - São Paulo – out 2011-jan 2012

Os valores $D_{18^{\circ}\text{C}}$ dos três queijos foram, respectivamente, 6,47, 3,71, 5,67 dias, sendo que a média ponderada pelas incertezas foi de $4,31 \pm 0,49$ dias, o que significa dizer que, com 95% de confiança, o valor $D_{18^{\circ}\text{C}}$ deste agente está compreendido entre 3,81 e 4,80 dias. Este é o tempo necessário para que haja redução de 90% da população da *Brucella* sp., ou seja, 1 ciclo logarítmico. A interpretação desse resultado deve ser cuidadosa porque, além da cepa estudada ser atenuada, o que pode alterar sua resistência às condições do ambiente em que se encontra, (nesse caso, o queijo) há ainda muitas lacunas no conhecimento da transmissão da doença, como por exemplo, o número de bactérias presente no leite de um animal infectado e a dose infectante da *Brucella abortus*.

Este resultado é inferior ao valor $D_{18^{\circ}\text{C}}$ obtido para *Mycobacterium bovis*, neste mesmo tipo de queijo, cuja média ponderada pelas incertezas foi de $37,5 \pm 5,3$ dias (STARIKOFF, 2011). Isso mostra que a *Brucella abortus* é menos resistente à cura que o *Mycobacterium bovis*, assim como também é menos resistente ao calor.

Deve-se, no entanto, salientar que o resultado obtido no presente estudo foi realizado com cepa de *Brucella abortus* menos patogênica ao homem, por questões de segurança para os pesquisadores, e que informações mais precisas quanto à segurança conferida pela cura deverão ser obtidas testando-se cepas circulantes no país, que tendem a ser mais resistentes

que cepas mantidas por longo período em laboratório (KLINJIN; HERREWENGH; JONG, 2001; PEARCE et al., 2001).

Na literatura são encontrados estudos referentes à presença de *Brucella abortus* em alimentos e derivados lácteos (CARPENTER et al., 1928; GILMAN et al., 1946; GILMAN et al., 1952; NASCIMENTO et al., 2002; MIYASHIRO et al., 2007; ZAFFARI et al., 2007), mas a confirmação da presença do agente é obtida em apenas parte desses (GILMAN et al., 1946; GILMAN et al., 1952; MIYASHIRO et al., 2007).

Observa-se que, por não haver metodologia oficial para a detecção do agente em alimentos, as técnicas empregadas pelos autores para avaliar a presença e sobrevivência de *Brucella* spp. são variadas. É importante ressaltar que a sensibilidade e especificidade de detecção do agente podem variar entre um método e outro, o que pode influenciar nos resultados e na sua comparação.

Dessa forma, são descritos na literatura pesquisas que visam comparar diferentes metodologias para detecção do agente em alimentos (LANGONI et al., 2000; TANTILLO et al., 2001; MIYASHIRO et al., 2007). O emprego do meio de cultura Farrel foi o método que demonstrou maior taxa de isolamento no trabalho de Langoni et al (2000), mas sua eficiência depende de variáveis (agentes viáveis e qualidade da amostra, tempo de coleta e de análise) que não influenciam a PCR, que indicou maior eficiência de detecção, mas sem distinção entre a viabilidade do agente (TANTILLO et al, 2001; MIYASHIRO et al, 2006).

Autores avaliaram a sobrevivência de *Brucella* spp. durante o armazenamento e/ou processamento de alimentos como água mineral (FALENSKI et al., 2011), creme de leite (Carpenter et al, 1928), iogurte (ESTRADA et al., 2005; FALENSKI et al., 2011), leite cru, leite cru certificado, leite UHT (FALENSKI et al., 2011) e manteiga (CARPENTER et al., 1928). Entretanto a literatura sobre a inativação de *Brucella* spp. durante a cura de queijos é limitada.

Gilman et al. (1946) analisaram a sobrevivência de *B. abortus* em queijo Limburger, fabricado a partir de amostra de leite conhecidamente infectado, com 57 dias de armazenamento sem observar sinais do agente em cobaias inoculadas. Em outro experimento, da mesma publicação, a partir de leite contaminado (1000 brucelas/ml de leite) foi fabricado

queijo cheddar e observada à viabilidade do agente em amostras de uma e duas semanas, um, três e seis meses (lesões pequenas), mas não em amostra de um ano de armazenamento. Após isso, Gilman et al. (1946) realizaram outra pesquisa em queijo cheddar confeccionado com leite infectado por menor carga do agente (700-800 brucelas/ml de leite) e notaram a viabilidade do agente em amostras de queijo armazenado por até um mês, três (lesões fracas), seis meses (5 cobaias negativas e 3 com lesões fracas); não sendo viável em amostra de um ano de armazenamento. Os dois últimos experimentos demonstram que o período de sobrevivência do agente em um alimento sofre influência da sua contaminação inicial, fato que também pode ser observado na pesquisa realizada por Estrada et al. (2005) em iogurte.

Em trabalho realizado por Plommet et al. (1988) foi verificada a sobrevivência de *B. abortus* em queijos Camembert fabricados a partir de leite obtido de vacas infectadas experimentalmente com 15×10^6 UFC. Os autores relatam que as contagens do agente permaneceram altas nas 20 horas iniciais de maturação (ao redor de $6, 6 \times 10^3$, $2,73 \times 10^4$ e $4,97 \times 10^4$ UFC/ ml nos queijos 1, 2 e 3 respectivamente), apresentando redução de acordo com a queda do pH, não sendo detectado o agente em cultivo microbiológico após 18 dias de maturação do queijo. Os resultados encontrados por Plommet et al. (1988) se aproximam mais dos encontrados nesta pesquisa, com detecção do agente por até 25 dias de maturação do queijo, do que os de Gilman et al. (1946), que observou sinais do agente em queijo cheddar em amostras com 6 meses de armazenamento. Entretanto, é importante ressaltar que a comparação dos dados dessas pesquisas deve ser cuidadosa, pois a taxa de inativação de um patógeno pode ser influenciada pela cepa empregada, contaminação inicial utilizada, temperatura de cura, características intrínsecas e extrínsecas do queijo em questão.

Na literatura são encontrados estudos sobre a sobrevivência de outros microrganismos durante a maturação de queijos. *L. monocytogenes* não foi detectada em queijo parmesão após 2 semanas de maturação a $12,8^\circ\text{C}$ (YOUSEF; MARTH, 1990); em queijos moles italianos (muçarela, crescenza, gorgonzola e ricota) foi observada após 15 dias de armazenamento a 4°C (CATALDO et al., 2007) e em queijos processados, mantidos a 4°C , por mais de 09 meses pós-inoculação (ANGELIDIS; BOUTSIOUKI; PAPAGEORGIOU, 2010). Belessi et al. (2008), observaram em seu estudo que a sobrevivência de *Listeria innocua* em queijo Feta é favorecida pela presença de fungos. Ressalta-se que a sobrevivência de um patógeno é também influenciada pelas características próprias do agente.

No estudo realizado por Carpenter et al. (1928) foram inoculadas quatro cepas diferentes de *Brucella* spp. em cada um dos alimentos da pesquisa (creme de leite e manteiga) e apesar de serem mantidas as mesmas condições de armazenamento, os períodos de sobrevivência do agente foram diferentes, enfatizando que cepas diferentes de um mesmo agente, possuem período de viabilidade distintos.

A porcentagem de gordura presente no alimento também influencia a inativação do agente, conforme foi observado por Falenski et al. (2011), que pesquisou a sobrevivência de *Brucella* spp. em iogurtes e encontrou resultados distintos para três concentrações diferentes de gordura. Esse fato ocorre devido à presença de gordura aumentar a resistência de alguns microrganismos ao calor (LANDGRAF, 1996). Depreende-se daí que, talvez, derivados lácteos com teor de gordura elevado tenham necessidade de maior tempo de maturação para conferir o mesmo nível de segurança que aqueles com menos gordura.

Há a necessidade de realizar novos estudos com cepas obtidas a campo, com diferentes temperaturas de cura, em queijos curados elaborados tanto com leite pasteurizado quanto com leite cru para obter mais informações, e assim subsidiar a tomada de decisão por parte dos legisladores para definir as estratégias de mitigação do risco de transmissão de brucelose pelo consumo de queijos curados.

5 CONCLUSÕES

No estudo observou-se que não houve isolamento do agente após 29 nove dias de cura a 18°C no queijo parmesão, ou seja, a contaminação, se presente, estava abaixo do limite de detecção da técnica (50UFC/g).

O protocolo apresentado pode ser empregado para estudos sobre o decaimento da população de *Brucella abortus* em queijos durante a cura e requer um maior número de repetições do processo e com cepas circulantes no país para se obter resultados mais precisos que permitam estimar o nível de segurança que a cura confere ao queijo.

REFERÊNCIAS

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Geneva: World Health Organization, 1975, p. 33-58.

ANGELIDIS, A. S.; BOUTSIOUKI, P.; PAPAGEORGIOU, D. K. Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22°C. **Food Microbiology**, v. 27, p. 809-818, 2010.

BELESSI, C. A.; PAPANIKOLAOU, S.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N. Survival and Acid Resistance of *Listeria innocua* in Feta Cheese and Yogurt, in the Presence or Absence of Fungi. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p.742–749, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 57 de 15 de dezembro de 2011**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 04 abr. 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 146 de 7 de março de 1996**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Regulamento Técnico Geral para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 04 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. 1952. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 07 mai. 2012.

CARPENTER, C. M.; BOAK, R. *Brucella abortus* in Milk and Dairy Products. **American Journal of Public Health**, v. 18, n. 6, p. 743-751, 1928.

CATALDO, G.; CONTE, M. P.; CHIARINI, F.; SEGANTI, L.; AMMENDOLIA, M. G.; SUPERTI, F.; LONGHI, C. Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 185-193, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Food Safety and Raw Milk**. Food Safety at CDC. 2011 (a). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/rawmilk/raw-milk-index.html>> Acesso em: 12 nov. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Raw (Unpasteurized) Milk**. CDC Features. 2011 (b). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/features/rawmilk/>>. Acesso em: 12 nov. 2011b.

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**, v. 61, p. 66-76, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite. **Estatísticas do leite: Industrialização do leite no Brasil – 2007**. [2008?]. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0406.php>>. Acesso em: 12 nov. 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite. **Estatísticas do leite: Leite inspecionado no Brasil, 2000/2011**. 2012 (b). Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite. **Estatísticas do leite: Ranking da Produção de Leite por Estado, 2010/2011**. 2012 (a). Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

ESTRADA, A. Z.; LA GARZA, L. M.; MENDOZA M. S.; LÓPES, E. M. S.; KERSTUPP, S. F.; MERINO, A. L. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 47, n. 3-4, p. 88-91, 2005.

FALENSKI, A.; MAYER-SCHOLL, A.; FILTER, M.; GÖLLNER, C.; APPEL, B.; NÖCKLER, K. Survival of *Brucella* spp. In mineral water, milk and yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 326-330, 2011.

FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. **World Health Organization Technical Report Series**. 6th Report. Geneva: World Health Organization, n. 740, 1986, p. 53.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA and CDC Remind Consumers of the Dangers of Drinking Raw Milk.** 888-INFO-FDA, FDA NEWS RELEASE. 2007.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108856.htm>>.

Acesso em: 12 nov. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Raw Milk Misconceptions and the Danger of Raw Milk Consumption.** Food Safety. 2011. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/MilkSafety/ConsumerInformationAboutMilkSafety/ucm247991.htm>>.

Acesso em: 12 nov. 2011.

FOODSAFETY.GOV. **Drinking Raw Milk: It's Not Worth the Risk.** Blog, 2011.

Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/blog/raw_milk.html>. Acesso em: 12 nov. 2011.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996, p. 112-113.

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

GILMAN, H. L.; MARQUARDT, J. C. The occurrence and survival of *Brucella abortus* in Italian cheese curd made from raw and pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 35, n. 6, p. 479, 1952.

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. B.; ALVS, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 35-45, 2009.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology.** 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998, p. 76-77.

HUBBERT, W. T.; HAGSTAD, H. V.; SPANGLER, E.; HINTON, M. H.; HUGHES, K.L. **Food Safety and Quality Assurance: Foods of Animal Origin.** 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing, 1996, p. 305.

JAY, J. M. High-temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. In: _____. **Modern Food Microbiology**, 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000, p. 341-362.

KLINJIN, N.; HERREWENGH, A. A. P. M.; JONG, P. Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; implications for interpretation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 697-704, 2001.

LANGONI, H.; ICHIHARA, S. M.; SILVA, A. V.; PARDO, R. B.; TONIN, F. B.; MENDONÇA, L. J. P.; MACHADO, J. A. D. Isolation of *Brucella spp* from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 0-0, 2000.

MARVULO, M. F. V.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GROFF, A. C. M.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 93-102, 2009.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ M. E. Detection of *Brucella abortus* in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2007.

NASCIMENTO, M. G. F.; CUNHA, C. P.; JESUS, V. L. T.; LIGNON, G. B.; NASCIMENTO, E. R. Levantamento de *Brucella abortus* em queijos Minas Frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 63-66, 2002.

OIE. The World Organisation for Animal Health. Bovine Brucellosis. In: _____. **Terrestrial Manual**. 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2012.

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

PEARCE, L. E.; TRUONG, H. T.; CRAWFORD, R. A.; YATES, G. F.; CAVAGNAC, 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.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G.; VACHOT, J. C.; COURAULT, M.; MUSSET, D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. **Le Lait**, v. 68, n. 3, p. 115-120, 1988.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.219-221.

SÃO PAULO (Estado). 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. 1994. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=33>. Acesso em: 12 nov. 2011.

STARIKOFF, K. R. **Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo**: definição de protocolo de estudo. 2011. 63 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TANTILLO, G.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 164-167, 2001.

VERGER, J. M. Comparaison des doses infectieuses 50% (DI50) de *Brucella melitensis* inoculée par voie conjonctivale, intragastrique et intrapéritonéale à la souris. **Annales de Recherches Veterinaires**, n. 2, p. 185-196, 1971.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Projeto Piloto de Meio de Cultura e Centrifugação

Objetivos

- 1 Comparar três diferentes conjuntos de antimicrobianos em Ágar Triptose (meio básico), acrescido de 5% v/v de soro fetal bovino estéril, visando observar qual dos três é mais efetivo para permitir o crescimento de *Brucella abortus* e inibir outras bactérias presentes no queijo. Os antimicrobianos utilizados foram os seguintes:
  - Meio A: Kit comercial Brucella Selective Supplement (Oxoid®) adicionado ao ágar triptose, uma das constituições de Meio Farrel sugeridas pela OIE (2009).
  - Meio B: Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico e Trimetropina; utilizados em outros trabalhos do laboratório para inibir o crescimento de bactérias presentes no queijo.
  - Meio C: observou-se que Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico e Trimetropina; estão presentes na composição do Kit comercial descrito acima, mas em concentrações diferentes das utilizadas para a confecção do meio B (menor para Polimixina B e ausente para Trimetropina no kit comercial). Assim, foi utilizado o kit comercial acrescido da diferença encontrada para Polimixina B e Trimetropina em relação às concentrações presentes no meio B.
- 2 Observar se há diferença de resultados realizando-se centrifugação, através da semeadura do homogeneizado, precipitado e sobrenadante nos meios de cultura.

Material e Métodos

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

Foi utilizada cultura de *Brucella abortus* 2308, variante do biovar 1 com 03 dias de cultivo em placa com ágar triptose, cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP. O inóculo foi preparado a partir de diluições em solução salina 0,8% estéril, baseadas na escala de McFarland. A partir da diluição de 0,5 (correspondente a aproximadamente 10^8 UFC/ml e menor diluição da escala), foram feitas mais duas diluições seriadas. 1 ml da solução representativa de 10^6 UFC/ml foi utilizada como inóculo.

Adquiriu-se queijo parmesão do comércio, 25g de queijo foram transferidos para embalagem estéril de plástico para stomacher, foram acrescidos 225 ml de caldo triptose 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 caldo triptose. Após homogeneização vigorosa em vórtex por 10 segundos, 0,1µl de cada diluição foi semeado, empregando micropipetas estéreis, em placas descartáveis contendo o meio em questão, que foram incubadas por 03 dias em estufa a 36°C. Também foi semeado o inóculo puro nas diluições equivalentes a 10^8 , 10^7 , 10^6 UFC/ml. As semeaduras foram feitas em duplicata.

O ágar triptose foi preparado conforme recomendação do fabricante Difco®. Foram pesados 20,5g do meio de cultura desidratado, acrescidos de água destilada (500 ml descontados os volumes do soro e das diluições dos antimicrobianos), homogeneizados e desinfetados em autoclave (121°C/15min). Em seguida esperou-se o esfriamento do meio até aproximadamente 50°C, momento no qual foram acrescidos 25 ml de soro fetal bovino estéril. Logo após foram acrescidos o suplemento seletivo comercial (diluído em 5ml de metanol e 5mL de água destilada estéril) para o meio A, 3,3mg Polimixina B 6000U, 25mg Anfotericina B, 10mg Ácido Nalidíxico e 2,5mg Trimetropina previamente diluídos em água estéril e filtrados, com seringa e filtro estéreis para o meio B e suplemento seletivo comercial (diluído em 5ml de metanol e 5ml de água destilada estéril), 2,5mg Polimixina B 6000U e 2,5mg Trimetropina também previamente diluídos em água estéril e filtrados para o meio C.

Resultados

Foram feitas leituras nos dias 1, 2 e 3 após semeadura. Foram feitas contagens de unidades formadoras de colônia.

Dia 1: Não foi observada nenhuma colônia nas placas nos meios A e C. No meio B foram visualizadas colônias grandes e médias brancas, lisas, não características de *Brucella abortus*:

Dia 2: Não foi observada nenhuma colônia nas placas com meios A e C. No meio B verificou-se o mesmo padrão encontrado no dia 01.

Dia 3: Não foi observada nenhuma colônia no meio C. A descrição dos resultados encontrados nos outros dois meios está descrita a seguir.

Meio A – Ágar Triptose com Suplemento Seletivo Comercial – Contagem de UFC no terceiro dia após semeadura.

	Homogeneizado	Precipitado	Sobrenadante
Inóculo 10^8 UFC/ml	Incontável	_____	_____
Inóculo 10^7 UFC/ml	Incontável	_____	_____
Inóculo 10^6 UFC/ml	Incontável, somente um tipo de colônia sugestivo de <i>B. abortus</i> .	_____	_____
10^{-1}	Incontável, somente um tipo de colônia sugestivo de <i>B. abortus</i> . (BIOQUÍMICO)	_____	_____
10^{-2}	Incontável (milhares), sugestivo de <i>B. Abortus</i> .	Incontável (milhares), sugestivo de <i>B. Abortus</i> . (BIOQUÍMICO)	Incontável (milhares), sugestivo de <i>B. abortus</i> .
10^{-3}	Incontável (centenas), sugestivo de <i>B. Abortus</i> .	Incontável (centenas), sugestivo de <i>B. Abortus</i> .	20, sugestivo de <i>B. abortus</i> .
10^{-4}	Colônias sugestivas de <i>B. abortus</i> .	Não foram observadas UFC.	5, sugestivo de <i>B. abortus</i> .
10^{-5}	0,5, sugestiva de <i>B. abortus</i> .	8, sugestivo de <i>B. abortus</i> .	Não foram observadas UFC.
10^{-6}	Não foram observadas UFC.	1, sugestivo de <i>B. abortus</i> .	Não foram observadas UFC.
10^{-7}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Meio B – Ágar Triptose com Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico e Trimetropina
– Contagem de Colônias no terceiro dia após semeadura.

	Homogeneizado	Precipitado	Sobrenadante
Inóculo 10^8 UFC/ml	Incontável	_____	_____
Inóculo 10^7 UFC/ml	Incontável (contaminante e <i>B. abortus</i> ?)	_____	_____
Inóculo 10^6 UFC/ml	Não foram observadas UFC.	_____	_____
10^{-1}	Incontável, 2 tipos de colônias, um deles sugestivo de <i>Brucella abortus</i> . (PCR).	_____	_____
10^{-2}	Incontável (milhares), dois tipos de colônias.	Incontável, colônias de diversos tipos (PCR).	4, diversas morfologias.
10^{-3}	Incontável, dois tipos de colônias.	Incontável, três tipos de colônias (PCR).	Incontável, nenhuma colônia característica de <i>B. abortus</i> .
10^{-4}	1,5, não características.	20, de diversas morfologias (PCR).	0,5, não característica.
10^{-5}	Não foram observadas UFC.	1 , de diversas morfologias (PCR).	Não foram observadas UFC.
10^{-6}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.
10^{-7}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Foi feito PCR das colônias com características macroscópicas semelhantes à *Brucella abortus* do meio B (apresentava mais de um tipo de colônia) e provas bioquímicas das colônias do meio A (crescimento de apenas um tipo de colônia sem contaminantes). As provas bioquímicas realizadas foram de oxidase, catalase, citrato, motilidade, TSI, indol, nitrato,

urease e produção de H₂S (ALTON, 1975). Tanto o PCR quanto as provas bioquímicas confirmaram se tratar de colônias de *Brucella abortus*.

Conclusão

O meio de cultura seletivo, preparado a partir de ágar triptose e suplemento seletivo comercial (uma das composições do meio Farrel), permitiu o crescimento de colônias de *Brucella abortus* e inibiu o crescimento de contaminantes, resultados não observados nos outros dois meios.

APÊNDICE B – Projeto Piloto para Padronização do Inóculo I

Objetivos

- 1 Analisar qual volume de inóculo será utilizado para realizar a contaminação do leite para a fabricação do queijo.
- 2 Comparar se contaminação bacteriana no queijo e no leite resulta em contagem semelhante de unidades formadoras de colônias nas placas com meio Farrel.

Material e Métodos

O inóculo foi preparado do mesmo modo que descrito no Apêndice A. Foram feitas duas amostras de queijo com dois volumes (8 ml e 4 ml) e três amostras de leite com três volumes diferentes (8ml, 4ml e 2ml) da solução representativa de 10^6 UFC/mL de *Brucella abortus*.

Foi transferido 25g de queijo parmesão, adquirido no comércio, para embalagem estéril de plástico para stomacher com 225ml de caldo triptose. A seguir foram colocados para macerar em stomacher da marca comercial Laboratory blender STOMACHER 400® em velocidade normal por 60 segundos.

No caso do leite foram contaminados 250 ml do leite, em frasco estéril, com cada um dos volumes de inóculo descritos acima, seguido de homogeneização.

O homogeneizado foi submetido à diluição decimal seriada até 10^{-6} e semeadura em placas descartáveis com meio Farrel, em duplicata (a técnica de diluição, confecção do meio e semeadura estão descritas no Apêndice A).

Resultados

Foi feitas leituras após 3 dias de semeadura. A contagem foi feita por unidades formadoras de colônia.

Amostra de leite – Contagem de UFC

	2ml do inóculo	4ml do inóculo	8ml do inóculo
10^0	Incontável	Incontável	Incontável
10^{-1}	Incontável	Incontável	Incontável
10^{-2}	Ao redor de 200	Ao redor de 200	Ao redor de 200.
10^{-3}	21	30	51
10^{-4}	4	Não foram observadas UFC.	6
10^{-5}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	0,5
10^{-6}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Amostra de queijo – Contagem de UFC

	4ml do inóculo	8ml do inóculo
10^{-1}	Incontável	Incontável
10^{-2}	Incontável	Incontável
10^{-3}	70	115
10^{-4}	40	25
10^{-5}	7	7
10^{-6}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Conclusão

As contagens de unidades formadoras de colônia para o leite e o queijo foram semelhantes. Os volumes utilizados de inóculo não demonstraram alteração significativa nas contagens, será feito novo teste com volumes que possuam 1 logaritmo de diferença entre um e outro.

APÊNDICE C – Projeto Piloto para Padronização do Inóculo II

Objetivo

Analisar qual volume de inóculo será utilizado para realizar a contaminação do leite durante a fabricação do queijo.

Material e Métodos

O inóculo foi preparado do mesmo modo que descrito no Apêndice A, entretanto foi utilizada a diluição de 0,5 da escala de McFarland (não se realizaram diluições a partir desse volume). Três amostras de leite com volumes diferentes (2ml, 0,2 ml e 0,02ml) da solução representativa de 10^8 UFC/ml de *Brucella abortus* foram semeadas.

Foram contaminados 250 ml do leite, em frasco estéril, com cada um dos volumes de inóculo descritos acima, seguido de homogeneização.

O homogeneizado foi submetido à diluição decimal seriada a partir de 10^{-1} até 10^{-4} e semeadura em placas descartáveis, em duplicata, com meio Farrel. (a técnica de diluição, confecção do meio e semeadura estão descritas no Apêndice A).

Resultados

Foram feitas leituras após 3 dias de semeadura. A contagem foi feita por unidades formadoras de colônia.

	0,02ml do inóculo	0,2ml do inóculo	2ml do inóculo
10^{-1}	50	Incontável (centenas)	Não foram observadas UFC.
10^{-2}	Não foram observadas UFC.	50	Incontável (centenas)
10^{-3}	Não foram observadas UFC.	5	100
10^{-4}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	10

Conclusão

Observou-se que o volume de 2ml do inóculo obteve resultados mais representativos para efeito de análise estatística.

APÊNDICE D – Projeto Piloto para Determinação de Carga de Contaminação

Objetivo

- 1 Analisar qual carga de inóculo será utilizado para realizar a contaminação do leite na fabricação do queijo.
- 2 Avaliar se a contaminação obtida a partir da escala de McFarland está sendo reproduzida adequadamente.

Material e Métodos

Foram preparados, a partir da menor diluição da escala de MacFarland (aproximadamente 10^8 UFC/ml), seguido de diluições seriadas, dois inóculos de *B. abortus* com carga bacteriana equivalente a 10^7 e 10^4 UFC/ml. Os inóculos foram feitos em triplicada.

Logo após, foi utilizado 1 ml de cada inóculo para contaminar amostras com 250 ml de leite, em frasco estéril, seguido de homogeneização.

O homogeneizado foi submetido à diluição decimal seriada até 10^{-4} , nas amostras de maior contaminação, e 10^{-2} , nas de menor contaminação. Em seguida foi realizada semeadura em placas descartáveis com meio Farrel, em duplicata (a técnica de diluição, confecção do meio e semeadura estão descritas no Apêndice A).

Resultados

Foram feitas leituras após 3 dias de semeadura. A contagem foi feita por unidades formadoras de colônia.

Inóculo 10^7 UFC/ml:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
10^0	Incontável (milhares)	Incontável (milhares)	Incontável (milhares)
10^{-1}	Incontável (milhares)	Incontável (milhares)	Incontável (milhares)
10^{-2}	125	Não foram observadas UFC.	65
10^{-3}	30	25	27
10^{-4}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Inóculo 10^4 UFC/ml:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
10^0	15	24	Não foram observadas UFC.
10^{-1}	2	2	Não foram observadas UFC.
10^{-2}	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.	Não foram observadas UFC.

Conclusão

O inóculo com carga microbiana de aproximadamente 10^7 UFC/ml apresentou contagem mais adequada na leitura das placas para análise estatística de resultados.

Observou-se que os resultados obtidos nas três amostras em cada uma das diluições foram equivalentes, houve reprodução dos resultados.

APÊNDICE E – Projeto Piloto para Padronização do Inóculo - *Brucella abortus* 1119-3

Objetivos

- 1 Avaliar se a *Brucella abortus* 1119-3, variante do biovar 1, apresenta crescimento em meio Farrel.

Material e Métodos

Brucella abortus 1119-3, variante do biovar 1, liofilizada foi ressuspensa em 3 ml de água miliQ autoclavada. Após homogeneização, 100 µl do homogeneizado foi semeado em ágar triptose, em triplicata.

Após três dias da semeadura, observou-se, no ágar, o crescimento de colônias de características macroscópicas compatíveis com *Brucella abortus* e foram feitos teste gram, análise microscópica e provas bioquímicas para comprovação.

Em seguida a partir de alçada das colônias foi feita diluição em solução salina 0,8% estéril, até atingir a diluição equivalente ao 0,5 da escala de McFarland (correspondente a aproximadamente 10^8 UFC/ml). Logo após foi feita mais uma diluição em salina para que se obtivesse 10^7 UFC/ml de inóculo. Pipetou-se 1 ml do inóculo obtido para contaminar 250 ml de leite, em frasco estéril, seguido de homogeneização. O homogeneizado foi submetido à diluição decimal seriada até 10^{-4} e semeadura em placas descartáveis com meio Farrel, em duplicata.

Resultados

Foram feitas leituras após 3 dias de semeadura.

	UFC
10^0	Incontável (milhares)
10^{-1}	155
10^{-2}	15
10^{-3}	2,5
10^{-4}	Não foram observadas UFC.

Conclusão

Brucella abortus 1119-3, variante do biovar 1 apresentou crescimento satisfatório em meio Farrel. Para a fabricação do queijo será utilizado o inóculo 10^8 UFC/ml, 1ml para cada 250 ml de leite.