

SUELY SANTOS BEZERRA

**DETECÇÃO DA *Brucella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
PRODUZIDOS COM LEITE CRU**

**RECIFE
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

SUELY SANTOS BEZERRA

**DETECÇÃO DA *Brucella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
PRODUZIDOS COM LEITE CRU**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Emiko Shinozaki Mendes

**RECIFE
2014**

B574d Bezerra, Suely Santos
Detecção da *Brucella* spp. em queijos de coalho produzidos
com leite cru / Suely Santos Bezerra. – Recife, 2014.
86 f. : il.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2014.

Referências.

1. *Brucella* 2. Queijo de coalho 3. Microbiologia I. Mendes,
Emiko Shinozaki, orientadora II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DA *Brucella* spp. EM QUEIJOS DE COALHO
PRODUZIDOS COM LEITE CRU**

Tese de Doutorado elaborada por

SUELY SANTOS BEZERRA

Aprovada em 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora - Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dr^a. Erivânia Camelo de Almeida
Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de PE - ADAGRO

Profa. Dr^a. Neide Kazue Sakugawa Shinohara
Departamento de Tecnologia Rural- UFRPE

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva
Departamento de Medicina Veterinária- UFRPE

DEDICO

À minha mãe Maria Ignez Santos Bezerra.

Palavras são insuficientes para agradecimentos e expressão do amor que sinto por você.

OFEREÇO

Ao meu querido avô, Antônio Menezes dos Santos, pai em exercício e meu norte.

À Simone Santos Bezerra. Posso dizer que sou uma felizarda por ter você como irmã.

A meu tio Nivaldo Gomes Bezerra, conexão com meu pai e presença especial em minha vida.

À Rachel Mattos Bastos, “in memorian” minha segunda mãe. Seu “toque” está em tudo de bom que realizo.

À Lorena Rodrigues “in memorian” que apesar do convívio tão fugaz, me ensina diariamente a “cuidar” de minhas escolhas. Nunca esquecerei o sorriso meigo e cativante com que nos premiou em sua passagem pelo Laboratório de Inspeção.

A Tom Meneses “in memorian” que sempre me recebeu com uma frase de entusiasmo na Coordenação da Pós-graduação em Ciência Veterinária. Muita saudade, meu caro.

A Wallace Campos que desde minha infância me brinda com uma palavra de carinho e entusiasmo.

À Sumaya Emília Martins Paulino, amiga guardada do lado esquerdo do peito mesmo com o tempo e a distância dizendo sempre não.

A Leonildo Bento Galiza, ex-professor, amigo muito amado, obrigada pelas contribuições pessoais e profissionais. Espero que continuemos próximos por mais um século.

À Cristiane Conde, o clichê de que amigos são a família que escolhemos é o que mais se encaixa em nossa relação. Obrigada pela eterna torcida, presença, cuidado, apoio e por permitir que eu faça parte da vida desta preciosidade que traz por nome Mariana.

A Leonardo Conde, primeiro contato que tive no aspecto “maternidade”, que hoje me chama de madrinha e a quem tenho tanto amor.

À Flávia Corrêa Maia, que desde a graduação me acompanha como amiga e confidente. Agradeço pela parceria além da presença e suporte inenarráveis nos dias que precederam a defesa.

A Rinaldo Malaquias Filho por sua amizade e disponibilidade.

A Paulo César Nunes Pereira do Rêgo, sempre presente em minhas vitórias e braço forte nas desventuras.

À Andrea Lobo, primeira pessoa que leu o esboço desta tese e me presenteou com ricas contribuições. Querida amiga de longa data.

À Virgínia Pedrosa, amiga sempre presente que tem, juntamente com sua família, lugar especial no meu coração.

À Pomy Kim, menina tímida que literalmente vi crescer e transformar-se em profissional competente, pela amizade, excelentes momentos de diversão e trabalho, além dos ensinamentos em microbiologia molecular.

À Nair Lira por todo o desprendimento pessoal e profissional que teve para comigo e por permitir que hoje eu a chame de amiga, obrigada por toda a ajuda.

À Monique Monteiro Pinto “ Compa” de bons e maus momentos, obrigada por tudo.

A José Wilton Jr. pela amizade e contribuições que favoreceram a redação deste trabalho.

À Camila Pereira, nova amiga que sempre trouxe palavras de força e tanto estimulou a redação deste trabalho.

À Rosaly de Fátima, de quem tanto gosto e que sempre tem uma palavra doce para me oferecer.

A Bruno e Patrícia Gusmão Dantas e seus respectivos núcleos familiares, que mesmo estando sempre geograficamente distantes, são tão próximos em atenção e carinho para comigo.

A Fernando Leandro dos Santos, que um dia me ouviu e compreendeu. Demorei um tanto para compreender o porquê do livro, como toda verdade, inicialmente difícil. Hoje, agradeço-lhe imensamente.

Aos alagoanos Andrey Gonçalves e Ricardo Marinho, amigos queridos e companheiros em excelentes momentos de minha vida.

À minha amiga e estatística particular, Paula T. Shinozaki Mendes, obrigada por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis e fazer os bons momentos sempre mais divertidos.

Ao Prof. Paulo de Paula Mendes pelas diversas palavras sábias com as quais me “presenteou” ao longo de todo o tempo que o conheço.

A Alexandre Duarte pelo apoio em parte desta caminhada.

A Guilherme Duarte, com quem tanto aprendi e que sempre está nos pensamentos da Tia Su.

AGRADEÇO

"Digamos, sempre, muito obrigada, pois nunca conquistamos nada sozinhos..."

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, minha segunda casa por tantos anos, por todos os ensinamentos que me proporcionou.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, na pessoa da Magnífica Reitora, Professora Cláudia Sansil, pelo tempo que me concedeu fora dessa Casa para a continuação de minha formação profissional.

À Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes, minha orientadora desde a graduação, por quem sempre terei inestimável gratidão pela sua participação em meu processo de formação profissional.

À EMBRAPA MEIO-NORTE, na pessoa da Médica Veterinária Karina Neoob de Carvalho Castro pela disponibilização das amostras e alguns insumos.

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, na pessoa do pesquisador Maurício Dasso, pela disponibilização de cepa de *Brucella*.

A Rodrigo Zeyemer Auad querido amigo, braço esquerdo e direito, por ter “vestido a camisa” do projeto, pelas palavras e ações de estímulo sem as quais a conclusão de meu doutoramento não seria possível.

À toda a equipe do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco especialmente: Fabíola Carneiro, Laelia Reginae, Valéria Rosa, Theodora Monteiro, Juliana Nunes Carvalho, Márcia Gomes de Souza, Renata Salgueiro, João Menezes Guimarães, César Calzavara Nóbrega, Arthur Vinícius, Zilmeire Marques, que em algum momento contribuíram, das mais diferentes formas, na construção deste projeto.

À minha querida Cleide, funcionária do Laboratório de inspeção de Carne e Leite, que por anos a fio acompanhou de perto meus bons e maus dias no pequeno/grande ambiente do laboratório, organizando tudo com tanto zelo e sorrisos compreensivos.

Aos professores Leonildo Bento Galiza e Rinaldo Aparecido Mota por permitirem o uso do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a realização das análises moleculares e por toda a atenção que sempre tiveram para comigo.

À equipe do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que sempre me recebeu com carinho mesmo quando eu “invadia” seu espaço, em especial a: André Motta, Eugênio Souza Küng e Bruno Alves.

À Ana Araújo (COMUT - UFRPE/BC), bibliotecária da UFRPE, que sempre se esforçou para a recuperação de artigos ditos impossíveis em tempo recorde, desde os idos de minha monografia de conclusão de curso, meu agradecimento e carinho.

Minha história de nada vale como exemplo para ninguém, pois, ao que parece, para nada serve este amontoado de acontecimentos sem sentido ao qual ordinariamente se dá o nome de experiência. Apenas sagrada e triste, contém ela, em si, a dor, as lágrimas, a exultação e os extravios enfim, o bem e o mal misturados que implica necessariamente, toda e qualquer história humana.

Ariano Suasuna, livre adaptação.

... Contudo...

*“Eu apenas queria que você soubesse
Que aquela alegria ainda está comigo
E que a minha ternura não ficou na estrada
Não ficou no tempo presa na poeira*

*Eu apenas queria que você soubesse
Que esta menina hoje é uma mulher
E que esta mulher é uma menina
Que colheu seu fruto flor do seu carinho*

***Eu apenas queria dizer a todo mundo que me gosta
Que hoje eu me gosto muito mais
Porque me entendo muito mais também***

*E que a atitude de recomeçar é todo dia toda hora
É se respeitar na sua força e fé
E se olhar bem fundo até o dedão do pé*

*Eu apenas queria que você soubesse
Que essa criança brinca nesta roda
E não teme o corte de novas feridas
Pois tem a saúde que aprendeu com a vida”*

Gonzaguinha

RESUMO

Doenças de origem alimentar estão fortemente associadas ao consumo de produtos de origem animal, tais como leite e seus derivados. Produzido, principalmente nos Estados do nordeste do Brasil, o queijo de coalho tem a maior parte de sua produção obtida de matéria-prima oriunda de rebanhos carentes de controle sanitário e em estabelecimentos que, por não contarem com boas práticas de fabricação, favorecem contaminações do produto e o tornam veículo de diferentes patógenos. Dado ao fato de a brucelose apresentar-se como uma das principais zoonoses que acometem bovinos leiteiros e pela possibilidade da *Brucella* ser veiculada por leite e derivados, objetivou-se pesquisar bactérias do gênero *Brucella* em 30 amostras de queijos de coalho produzidos com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba-PI, adquiridas no período de novembro de 2011 a janeiro de 2012. Foram utilizados métodos tradicionais da microbiologia e reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo a bactéria identificada por ambas as técnicas. Para as análises microbiológicas tradicionais, utilizaram-se Ágar *Brucella* e Ágar Thayer Martin suplementados com sangue de carneiro defibrinado e com os antibióticos comerciais Brucella[®] (sulfato de polimixina B: 2500 IU/0,5L, bacitracina: 12500 IU/0,5L, nistatina: 50000IU/0,5L, cicloheximida: 50.00 mg/0,5L, ácido nalidixico: 2.50 mg/0,5L e vancomicina: 2.50 mg/0,5L) e V.C.N.T.[®] (vancomicina: 1.50 mg/0,5L, sulfonato metano colistina: 3.75 mg/0,5L, trimetoprim: 2.50 mg/0,5L e nistatina: 6250 unidades/0,5L). As colônias morfológicamente suspeitas foram confirmadas em nível de gênero pelo método de reação da polimerase em cadeia (PCR). Nas análises realizadas diretamente por PCR, as amostras foram submetidas à extração de DNA a partir de alíquotas de 200 µL de uma suspensão dos queijos em caldo *Brucella*. Os primers de eleição foram aqueles que têm por alvo região 16S-23S do rRNA para *Brucella* spp.: ITS66: ACATAGATCGCAGGCCAGTCA e ITS279: AGATACCGACGCAAACGCTAC. Das 30 amostras analisadas em duplicatas por métodos tradicionais da microbiologia foram isoladas colônias suspeitas de 11, todas cultivadas em ágar Thayer Martin. Dessas, sete foram confirmadas por PCR como bactérias do gênero *Brucella*, procedentes de seis amostras. Sete amostras foram positivas quando analisadas diretamente por PCR. Conclui-se que os queijos de coalho comercializados na cidade de Parnaíba são veículos em potencial de *Brucella* spp. para seus consumidores, o que denota a necessidade de maior controle em toda a cadeia produtiva desse produto, principalmente no tocante à sanidade dos rebanhos leiteiros, fonte primária de contaminação, além de um acompanhamento constante da qualidade do produto oferecido à população de forma a minimizar riscos à saúde pública.

ABSTRACT

Food diseases are strongly associated with the consumption of animal products such as milk and dairy products. Produced mainly in the states of northeastern Brazil, the curd cheese has most of its production from raw material originating from herds of poor sanitary control and establishments, not to count on good manufacturing practices, favoring the contamination product and make vehicle pathogens. Given the fact brucellosis presents itself as a major zoonoses that affects dairy cattle and the possibility of *Brucella* be conveyed by milk and dairy products, this work aimed to search the *Brucella* genus bacteria in 30 samples of curd cheese produced from raw milk, marketed in the Parnaíba –PI, Brazil, acquired in the period November 2011 to January 2012. Traditional methods of microbiology and polymerase chain reaction (PCR) were used, so the bacteria identified by both techniques. For traditional microbiological analysis on utilized the *Brucella* agar and the Thayer Martin agar supplemented with sheep blood and commercial antibiotics *Brucella*® (polymyxin B sulfate : 2500 IU / L 0.5 , bacitracin : 12500 IU / L 0.5 , nystatin : 50000IU / 0.5L , cycloheximide : 50.00 mg / L 0.5 , nalidixic acid : 2.50 mg / L and 0.5 vancomycin : 2.50 mg / L 0.5) and VCNT® (vancomycin : 1.50 mg / L 0.5 , sulfonated colistin methane : 3.75 mg / L 0,5 , trimethoprim : 2.50 mg / L and 0.5 nystatin : 6250 units / 0.5 L). Morphologically suspicious colonies were confirmed at genus level by the method of polymerase chain reaction (PCR). In analyzes directly performed by PCR, the samples were submitted to DNA extraction from aliquots of 200 µl of a suspension cheeses in *Brucella* broth. Primers election were those that target 16S - 23S rRNA *Brucella* spp.: ITS66: ACATAGATCGCAGGCCAGTCA and ITS279: AGATACCGACGCAAACGCTAC. Among the 30 samples analyzed in duplicate by traditional methods of microbiology, 11 suspected colonies were isolated, all grown on Thayer Martin agar. Among these, seven were confirmed by PCR as bacteria of the genus *Brucella*, coming from six samples. Seven samples were positive when analyzed directly by PCR. It can be concluded that curd cheese sold in the city of Parnaíba – PI, Brazil, are potential vehicles of *Brucella* spp. to their consumers, which indicates the need for greater control throughout the production chain of this product, especially concerning health of dairy cattle, the primary source of contamination, as well as constant monitoring of the quality of the product offered to the population in order to minimize risks to public health.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 01:	Parto de vaca em pasto, propiciando a contaminação do mesmo por agentes de zoonose como a <i>Brucella</i>	25
Figura 02	Veterinário de 32 anos acidentalmente inoculado com a vacina para a profilaxia da brucelose animal B19.....	26
Figura 03	A evolução mostra abscesso da mão.....	26
Figura 04:	Leite e alguns de seus derivados.....	29
Figura 05:	Queijo de coalho.....	33
Figura 06:	Inoculação em ágar Thayer Martin de suspensão de queijo de coalho em caldo <i>Brucella</i>	35
Figura 07:	Brasil, Piauí, Cidade de Parnaíba.....	38

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 01:	Espécies de <i>Brucella</i> e respectivos biovares.....	22
Tabela 02:	Valores da cadeia produtiva do leite na cidade de Parnaíba-PI.....	39

Artigos científicos

Artigo 1:

Tabela 01:	Tratamentos para inoculação de suspensão de caldo <i>Brucella</i> em ágar	46
Tabela 02:	Resultados averiguação de presença de bactérias do gênero <i>Brucella</i> em queijos de coalho produzidos com leite cru comercializados na cidade de Parnaíba-PI.....	47
Tabela 03:	Tentativas de isolamento de <i>Brucella</i> por microbiologia convencional em queijos.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	<i>Brucella</i> e brucelose.....	22
3.1.1	Agente etiológico.....	22
3.1.2	Distribuição e notificações.....	23
3.1.3	Brucelose em bovinos.....	24
3.1.4	Brucelose em humanos.....	26
3.2	Relação da brucelose humana com lácteos.....	28
3.3	Queijo de coalho artesanal.....	32
3.4	Identificação da <i>Brucella</i>.....	36
3.5	A cidade de Parnaíba.....	38
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	42
4.1	Isolamento da <i>Brucella</i> spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru.....	43
4.2	Detecção da <i>Brucella</i> spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR)	54
5	REFERÊNCIAS.....	63
6	ANEXOS.....	72
6.1	Normas para submissão de artigo científico da Brazilian Journal of Microbiology.....	73
6.2	Normas para submissão de artigo científico da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	80

A brucelose, inicialmente, era considerada uma doença de caráter ocupacional. Na atualidade, por diversos fatores, a epidemiologia dessa zoonose sofreu várias modificações, que fizeram com que a mesma fosse também considerada uma importante doença transmitida por alimentos.

Os primeiros casos de brucelose relatados estão associados ao consumo de proteínas animais, seja pela ingestão de leite e seus derivados ou outros produtos alimentícios originados de animais infectados (SPINOLA e COSTA, 1972; D'ANASTASIO et. al., 2011). Alguns surtos de doenças de origem alimentar têm sido estreitamente relacionados ao consumo de queijos fabricados a partir de leite cru, que, nas últimas décadas, têm sido classificados como “alimentos arriscados”, com associação à veiculação de *Brucella* (WEST, 2008).

Largamente fabricado principalmente nos Estados do nordeste do Brasil, o queijo de coalho se destaca entre os principais queijos artesanais, de fabricação e consumo comprovadamente incorporados à cultura regional de tradição secular. A maior parte de sua produção tem origem em pequenas e médias queijarias e, apesar de apresentar importância econômica e grande popularidade, sua elaboração não envolve boas práticas de fabricação que garantam a oferta de um produto seguro e de qualidade (CAVALCANTE, 2005; NASSU et al. 2006; SANTANA et al., 2008; COSTA, 2009; FREITAS FILHO et al., 2009).

Toda a cadeia produtiva do queijo de coalho está envolvida com a possível transmissão de *Brucella*, contudo, mesmo se o produto final fosse submetido à fiscalização efetiva, guiada por uma legislação adequada à realidade da saúde pública, o consumidor não estaria livre da contaminação por este agente de zoonose, dada a inviabilidade de se pesquisar todas as bactérias patogênicas em um alimento.

Além disso, associadas às dificuldades legais, somem-se aquelas de isolamento por microbiologia convencional, por a *Brucella* ser um micro-organismo fastidioso, de detecção e isolamento caros e demorados. Espera-se que, no futuro, o diagnóstico pelo método da reação da polimerase em cadeia (PCR) seja reconhecido por legislação, suprimindo em parte, os fatores negativos observados no uso da microbiologia convencional.

Por outro lado, a cidade de Parnaíba-PI possui a maior bacia leiteira da região do delta do rio Parnaíba. Além de comercializar leite e seus derivados produzidos na cidade, parte desses produtos, em especial queijos de coalho, são provenientes de cidades e Estados vizinhos, como o Maranhão, apresentando, assim, uma grande diversidade de origem da matéria-prima e do produto final.

A partir de proposição de pesquisadores da EMBRAPA MEIO-NORTE – Parnaíba em investigar o assunto ora apresentado, e dada a importância que assume a ingestão de alimentos que podem veicular o agente etiológico da brucelose, objetivou-se pesquisar bactérias do gênero *Brucella* em queijos de coalho produzidos com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba-PI.



2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Verificar se queijos de coalho produzidos com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba-PI, podem ser um potencial veículo de *Brucella* para os consumidores.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Pesquisar *Brucella* spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru utilizando microbiologia convencional;

- ✓ Pesquisar diretamente *Brucella* spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru utilizando a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR).

3.1 *Brucella* e brucelose

3.1.1 Agente etiológico

Brucella é a bactéria responsável por causar a enfermidade denominada brucelose. Apresenta morfologia de cocos, cocobacilos ou bastonetes curtos com dimensões de 0,5-0,7 x 0,6-1,5 µm, negativos à coloração de Gram, imóveis, micro-aerófilos e não produtores de sistemas de resistência. As colônias podem se apresentar lisas ou rugosas de acordo com a camada lipopolissacarídica de sua membrana celular. A temperatura ótima de desenvolvimento é de 37°C, não suporta temperaturas acima de 62°C, resiste ao congelamento, mas tem desenvolvimento e multiplicação inibidos abaixo de 5°C. Apresenta pH ótimo entre 6,6 a 7,4 e é destruída naqueles inferiores a 4.2. O crescimento é promovido em meios de cultivos complexos adicionados de soro e/ou sangue (PESSEGUEIRO et al., 2003; GOMES, 2005; LAWINSKY et al., 2010).

Antes do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, a diferenciação das várias espécies de *Brucella* e seus biovars era baseada em informações fenotípicas, perfis metabólicos e de aglutinação com antissoro monoespecífico. Outro critério importante para a diferenciação das várias espécies de *Brucella* foi a preferência natural por determinado hospedeiro, razão pela qual os nomes das espécies foram dados de acordo com o seu hospedeiro preferido. Após a descoberta do parentesco DNA-DNA acima de 70%, entre todas as espécies de *Brucella*, e diversas modificações taxonômicas, em 2003, o Subcomitê sobre a Taxonomia de *Brucella* pertencente ao Comitê Internacional de Sistematização de Procariotos aprovou por unanimidade um retorno à taxonomia da *Brucella* determinada em 1986 e o reconhecimento de suas seis espécies e respectivos biovars como descrito na tabela 01:

Tabela 01: Espécies de *Brucella* e respectivos biovars.

Espécies de <i>Brucella</i>	Biovars
<i>Brucella melitensis</i> (Hughes/1983) Meyer and Shaw/1920	1, 2 e 3
<i>Brucella abortus</i> (Schmidt/1901) Meyer and Shaw/1920	1 à 9
<i>Brucella suis</i> Huddleson/1929	1 à 5
<i>Brucella ovis</i> Buddle/1956	-
<i>Brucella neotomae</i> Stoenner and Lackman/1957	-
<i>Brucella canis</i> Carmichael and Bruner/1968	-

O Subcomitê vem trabalhando, ainda, no reconhecimento de novas espécies isoladas de mamíferos marinhos que têm os nomes propostos de *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae*. Além dessas, foi descrita uma nova espécie isolada a partir da secreção de feridas de um implante mamário e do sangue de uma mulher de 71 anos com sintomas clínicos compatíveis com a brucelose, provisoriamente denominada *Brucella inopinata* (OSTERMAN e MORIYÓN, 2006; SCHOLZ et.al., 2010).

3.1.2 Distribuição e notificações

A brucelose é a zoonose bacteriana mais comum em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH/OIE), observa-se maior incidência em animais no Meio Leste mundial, na região do Mediterrâneo, na África Subsaariana, China, Índia, Peru e México e tem-se observado um aumento de casos em países do centro e sudoeste da Ásia. Acredita-se que vários países do Oeste e do Norte da Europa, além de Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia estejam livres do agente (CUTLER et al., 2005; OIE, 2013).

Na última década, contudo, observou-se uma mudança drástica na epidemiologia da brucelose humana, provocada por várias razões sanitárias, sócio-econômicas e políticas e pelo aumento do número de viagens internacionais. Áreas tradicionalmente consideradas endêmicas como França, Israel e parte da América Latina têm alcançado o controle da doença e novos focos surgiram, particularmente na Ásia Central, enquanto a situação em alguns países do Oriente Médio vem piorando rapidamente. A doença está ainda presente tanto em países da Europa, quanto nos Estados Unidos (PAPAS et.al., 2006; DAHOUK et al., 2007).

A brucelose causada por *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, em bovinos, ovinos, caprinos e suínos é listada na Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH/OIE), no Código Sanitário dos Animais Terrestres e qualquer ocorrência em animais deverá ser devidamente comunicada ao órgão de fiscalização sanitária competente (OIE, 2013).

No Brasil, a escassez de dados epidemiológicos, além da pequena divulgação em meios científicos acerca da prevalência da brucelose têm dificultado uma análise comparativa entre as regiões e a formação de uma imagem real do impacto sócio econômico da enfermidade (POLETTTO et.al., 2004). Tal situação é “justificada” devido ao fato de a mesma apresentar característica essencialmente crônica polimorfa, tornando difícil determinar a incidência e prevalência dessa patologia nas populações (SPINOLA e COSTA, 1972; PURWAR, 2007).

3.1.3 Brucelose em bovinos

Nesses animais, a principal porta de entrada da *Brucella* é a digestiva, podendo também dar-se na reprodução, por monta natural, mas, principalmente, pela inseminação artificial (VIANA et al., 2010).

A fêmea portadora pode propiciar a infecção do macho durante a monta, transformando-o em fonte de infecção para outras fêmeas. Nos touros ou em carneiros, as brucelas podem se localizar nos órgãos genitais. Através do trato gastrointestinal, a infecção pode ocorrer por ingestão de pastos, forragens e água contaminada com brucelas. O hábito de lambeir membranas fetais, fetos e bezerras recém-nascidos constitui importante fator de risco. Do mesmo modo, o hábito de lambeir os órgãos genitais de outras vacas também favorece a transmissão da infecção (GERMANO e GERMANO, 2001).

Os sinais clínicos estão relacionados principalmente à esfera reprodutiva. Nas fêmeas, a doença é caracterizada por abortos no terço final da gestação, metrite e retenção de placenta. Já nos touros, a patogenicidade do agente está associada à infecção das glândulas acessórias e aos testículos, sendo sinais comuns quadros de vesiculite e, secundariamente, de orquite e epididimite. As alterações causadas são encontradas nos órgãos reprodutores e no tecido retículo-endotelial. As lesões no trato reprodutor, na placenta e nos fetos levam frequentemente os animais infectados a sub e/ou infertilidade, que causa perda reprodutiva nos rebanhos pelos sucessivos abortamentos e pela baixa produção de leite, gerando perdas econômicas importantes (GOMES, 2005; MONTEIRO et al., 2006; GUIMARÃES e LANGONI, 2009; JÚNIOR et al., 2012).

As células de *Brucella* podem se localizar cronicamente nos nódulos linfáticos supramamários e nas glândulas mamárias de 80% dos animais infectados. Assim, os animais continuam a secretar o agente patogênico em seus fluidos corporais. Uma vaca brucélica pode eliminar quantidades de *Brucella* suficientes para contaminar todo o rebanho de uma região, seja através das membranas fetais, dos corrimentos puerperais ou do leite (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; PACHECO et al., 2008).



Figura 1: Parto de vaca em pasto, propiciando a contaminação do mesmo por agentes de zoonose como a *Brucella*. Fonte: rehagro.com.br, 2014.

No Brasil, a brucelose bovina foi diagnosticada clinicamente pela primeira vez em 1914, só vinte e dois anos mais tarde Desidério Finamor detectou a doença através do sorodiagnóstico e propôs um plano para seu combate (PAULIN e FERREIRA NETO, 2002).

A facilidade com que algumas espécies do gênero *Brucella* podem se constituir em agente de zoonose ressalta a importância no controle da enfermidade. Além de gerar um problema de saúde pública e ocupacional, tanto pelo número de enfermos acometidos quanto pelas importantes perdas econômicas que provoca, dificulta a comercialização internacional de animais, seus produtos e sub-produtos e de interferir na capacidade plena de produção por causar reduções na produtividade animal (COELHO et al., 1995; FELICIANO et al., 2004; POLETTO et al., 2004; GOMES, 2005; PACHECO et al., 2008).

O controle da doença passa pela identificação sorológica dos animais positivos e o seu descarte, além da vacinação de fêmeas antes da puberdade (de responsabilidade do Médico Veterinário); vigilância sanitária de produtos de origem animal como leite e derivados e cuidados no manejo para a retirada de placentas, secreções e fetos dos animais (GUIMARÃES e LANGONI, 2009; SANTOS e FONSECA, 2012).

Assim, a exemplo de outros países que buscam a erradicação da brucelose, o Brasil lançou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que centra seu plano de ação na vacinação de bezerras entre os três e oito meses de idade e no controle do trânsito animal, sendo livre de adesão o saneamento de rebanhos (VIANA et al., 2010).

O PNCEBT enfatiza, ainda, que se os programas de qualidade do leite e da carne forem incorporando o controle da brucelose e da tuberculose, exigindo que os produtos sejam procedentes de propriedades livres, a preocupação com a saúde animal e a saúde pública será entendida como parte do processo de produção, mais do que como uma imposição do serviço

de defesa sanitária, aplicando o princípio da segurança dos alimentos do campo à mesa (BRASIL, 2006).

3.1.4 Brucelose em humanos

A brucelose é a zoonose mais comum em todo o mundo. Sua transmissão pode ocorrer direta ou indiretamente ao homem a partir do contato com animais doentes, suas secreções e excreções incluindo aerossóis. As formas mais comuns de infecção humana se dão devido à atividade profissional ou pela ingestão de alimentos contaminados, geralmente produtos e subprodutos de origem animal, principalmente leite cru e seus derivados. A transmissão entre humanos não é comum, mas já foi relatada em transfusão sanguínea e de medula. Dada a inexistência de vacinas para a brucelose humana e sua alta capacidade de morbidade, o agente foi incluído na categoria B de agentes de bioterrorismo pelo Centro de Controle de Doenças norte americano (COELHO et al., 1995; MORALES e COMBARIZA, 2004; TESKE et al., 2011).

Os grupos ocupacionais mais afetados são aqueles que lidam diretamente com animais, seus produtos e subprodutos, tais como fazendeiros, vaqueiros, médicos veterinários e magarefes, além de indivíduos que trabalham em laboratórios de pesquisa, manipulando o agente. A infecção de trabalhadores de abatedouros pode ocorrer pelo contato direto com as carcaças de animais infectados e/ou pela formação de aerossóis. Veterinários de campo e tratadores podem se infectar durante a vacinação dos animais contra brucelose, pelo manuseio de vacinas e durante partos, pelo contato com placenta e outros materiais contaminados. Afeta, ainda, os trabalhadores que lidam com gado leiteiro e beneficiamento de leite e derivados (MORALES e COMBARIZA, 2004; SANTOS et al., 2007; GUIMARÃES e LANGONI, 2009; EKER et al. (2011); DIAS, 2012).



Figuras 02 e 03: Veterinário de 32 anos acidentalmente inoculado com a vacina para a profilaxia da brucelose animal B19 (figura 02). A evolução mostra abscesso da mão (figura 03).
Fonte: <http://www.obeabadosertao.com.br>, 2014.

Em países onde há métodos de rastreio rigoroso, a doença já não é endêmica, mas casos esporádicos são constantemente relatados. Em muitos países em desenvolvimento, no entanto, a situação é diferente: a doença é endêmica e subdiagnosticada. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que meio milhão de casos são registrados no mundo a cada ano, e que para cada caso diagnosticado há quatro casos sequer diagnosticados. A principal razão para isso é que grandes populações residentes em áreas rurais estão em contato direto com gado e esses grupos muitas vezes adotam certas práticas, como consumo de leite cru, sob a crença de que é mais nutritivo do que suas apresentações em forma fervida ou pasteurizada. Além disso, o gado é geralmente mantido perto da casa e seus partos muitas vezes realizados sem qualquer equipamento de proteção individual, tais como luvas, máscaras e batas (PURWAR, 2007).

A enfermidade predomina em adultos, entre 20 e 50 anos de idade, sendo excepcionalmente observada na infância. O sexo masculino é o mais acometido, na proporção de cinco casos em homens para um em mulheres, provavelmente pela maior exposição e pelas atividades profissionais desenvolvidas pelos homens (DIAS, 2012). Desde 1972, Spinola e Costa já citavam em seus relatos o fato da brucelose apresentar-se como doença ocupacional. Inquéritos sorológicos realizados em várias regiões rurais brasileiras e também em trabalhadores de frigoríficos, sugerem que a brucelose ainda é bastante frequente em nosso meio (TRABULSI e ALTHERTHUM, 2008).

No humano, o período de incubação da brucelose pode variar de 2 a 8 semanas a meses. A sintomatologia é inespecífica e a bactéria pode afetar qualquer órgão ou sistema, sendo o trato gastrintestinal, hepatobiliar e o sistema esquelético os mais afetados. Os sintomas de quadro agudo em humanos incluem febre, diaforese, calafrios, anorexia, artralgia, dor nas costas, fraqueza e mal estar generalizado, apresentando-se, muitas vezes, semelhante a um quadro de resfriado. Em casos crônicos, observa-se febre recorrente, processos inflamatórios nas articulações (principalmente sacroilíacas e joelhos) além de fadiga. Em crianças são comuns febre, artrite/artralgia e hepatoesplenomegalia; o envolvimento das grandes articulações pode atingir 58% dos casos (CUNHA et al., 2002; MORALES e COMBARIZA, 2004; PACHECO et al., 2008; MONTALVO et al., 2010).

Endocardite complicada por insuficiência cardíaca é a principal causa de morte por brucelose. Em 21% dos pacientes do sexo masculino, a patologia pode afetar os testículos levando à epididimo-orquite e, secundariamente à infertilidade. Abscesso esplênico,

envolvimento do sistema nervoso central e múltiplas manifestações cutâneas foram também relatadas (PURWAR, 2007).

Com tamanha variabilidade de manifestações clínicas da brucelose, os médicos muitas vezes não conseguem chegar ao diagnóstico, a menos que tenham fortes motivos expressos no histórico do paciente que o levem a suspeitar desta patologia (MILLER e PAIGE, 1998; PURWAR, 2007). O diagnóstico também é difícil, por vezes, devido às hemoculturas demorarem, variando de uma a quatro semanas pela natureza de crescimento lento da *Brucella*, muitas vezes expressando falsos negativos (PURWAR, 2007).

Em situações de surtos, devem ser investigadas as vias de transmissão que, em geral, são o leite e derivados não pasteurizados e confiscar alimentos suspeitos até que sejam instituídas medidas de prevenção definitivas. Atividades laboratoriais devem ser acompanhadas de medidas rigorosas de biossegurança (GUIMARÃES e LANGONI, 2009).

Em termos de saúde pública o controle da zoonose passa obrigatoriamente pela pasteurização de leite e derivados além da realização de atividades de educação em saúde, informando a população sobre a importância de se consumir leite e derivados pasteurizados; e aos trabalhadores que cuidam de animais sobre os riscos da doença e cuidados no contato com animais doentes (GUIMARÃES e LANGONI, 2009; SANTOS e FONSECA, 2012).

De acordo como Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS (BRASIL, 2013), do Ministério da Saúde, de janeiro de 2008 até março de 2013 no Brasil, foram registradas 162 internações devido à brucelose, e 07 óbitos no âmbito do SUS. Desses, em todo o Nordeste somam-se 27 internações (uma no estado do Piauí) e dois óbitos.

3.2 Relação da brucelose humana com lácteos

Com a globalização, ficaram mais evidentes os problemas relativos à qualidade dos alimentos para consumo humano. Atualmente, a contaminação biológica de alimentos é um problema de saúde pública no Brasil e em todo o mundo por representarem uma das principais causas de morbidade em diversos países (BALBANI e BUTUGAN, 2001; ALMEIDA, 2010).

Diversos são os agentes biológicos de infecções e toxinfecções veiculadas por alimentos, alguns bem caracterizados, com patogenia e epidemiologia bem conhecidos, como o *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* e salmonelas e suas espécies, de uma forma geral; além dos micro-organismos ditos emergentes, que incluem *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, entre outros. Boa parte

desses agentes patogênicos têm por reservatórios animais de produção saudáveis ou aparentemente saudáveis, de onde se espalham para uma crescente variedade de alimentos causando milhões de casos agudos e crônicos, constituindo um grande desafio de saúde pública às nações (TAUXE, 1997; ROSSI JR. et al., 2000).

Dado ao fato da infecção poder ocorrer por via digestiva, inclui-se a brucelose no contexto das doenças veiculadas por alimentos (CARVALHO et al. 1995; ZAFFARI, 2005). No homem, das espécies conhecidas as *B. abortus*; *B. suis*, *B. melitensis* e *B. canis*, provocam doença e todas, exceto a última espécie citada, podem ser transmitidas principalmente pela ingestão ou manipulação de leite contaminado, contato direto com tecidos infectados, inalação e inoculação acidental de vacina animal (SOUZA et al. 1977; PESSEGUEIRO et. al., 2003; PACHECO et.al., 2008).

Dentre os alimentos responsáveis por toxinfecções alimentares, o leite e seus derivados merecem especial atenção, pois paralelamente à sua importância como fonte nutricional, também são excelentes meios para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, largamente consumidos pelas populações em todas as faixas etárias (PADILHA et al., 2001; LANGONI et al., 2011).



Figura 04: Leite e alguns de seus derivados.
Fonte: esportes.terra.com.br, 2014.

Os riscos à saúde humana, relacionados às toxinfecções veiculadas por leite e seus derivados, podem ser resultado do consumo desses produtos crus contaminados ou, ainda, por contaminação durante sua obtenção, transporte até as usinas de pasteurização; por erros na pasteurização ou após a mesma; na elaboração de derivados lácteos em locais cujos cuidados sanitários são insatisfatórios; além da possibilidade de contaminação durante a manipulação pelo próprio consumidor (BALBANI e BUTUGAN, 2001; LANGONI et al., 2011).

Segundo Langoni et. al. (2011) não somente o leite cru contaminado, mas também seus derivados, dentre eles os queijos frescos, têm sido a principal fonte de infecção nos casos de brucelose em humanos, visto que a *Brucella* pode sobreviver nesses alimentos, dependendo do tipo de processamento, de duas semanas a três meses, nos estágios de maturação e de acidificação aos quais cada produto é submetido.

A *Brucella* pode sobreviver em queijos por um tempo superior que em qualquer outro derivado lácteo, dadas as suas características físicas e químicas, fazendo com que pesquisadores incriminem o produto como fonte mais provável na transmissão de *Brucella* aos indivíduos que consomem derivados originados de leite cru (EL-DAHER et al., 1990).

Após o primeiro isolamento do micro-organismo por David Bruce em 1887 de soldados ingleses que faleceram por “Febre de Malta” e da posterior descoberta da relação da *Brucella* com o consumo de leite de cabra e derivados (KONEMAN et al., 2008), em todo o mundo, parte dos novos casos de infecção humana por *Brucella* spp. são associados ao consumo de queijo produzido com leite cru (CARVALHO et al. 1995).

Capasso (2002) e D’Anastasio et al. (2011) citaram que a primeira indicação de uma possível associação entre lesões humanas causadas por *Brucella* ao consumo de queijos fabricados com leite cru data de 79 a.C. Esses produtos foram incriminados como importante fonte de brucelose na população romana, após a identificação de restos bacterianos com forma de coco bacilo em queijo carbonizado encontrado em sítio arqueológico.

Informações coletadas desde 1990 na Califórnia, no Texas, no México e Oriente Médio, mostram *B. melitensis* emergindo como organismo causador da doença predominante na população que incluía mulheres, crianças e hispânicos. Os aumentos vistos na incidência de *B. melitensis* em mulheres e crianças refletem um novo padrão de transmissão através do consumo de leite não pasteurizado e de produtos lácteos originados de leite de cabra. A maior prevalência de casos ocorre no Texas e na Califórnia, responsáveis por 53% de todos os casos durante o período 1987:1992 (MILLER e PAIGE, 1998).

Monsalve et al. (1996) discorrem acerca de um surto em Castilla-La Mancha, Espanha, onde foram registrados 81 casos de brucelose num espaço de 25 semanas, estreitamente relacionados ao consumo de um queijo fresco artesanal fabricado por um produtor do município.

Na região Nordeste do Brasil é comum o consumo de queijos de coalho originados de leite crus, de origem artesanal inclusive no momento de sua compra a título de “prova” (MAGALHÃES e LIMA, 1997). Os autores descreveram um caso de brucelose humana

ocorrido no estado de Pernambuco. O paciente, um diplomata americano, adquiriu a doença pela ingestão de queijo de coalho cru.

Além disso, a movimentação do produto às zonas urbanas, como parte do processo de comercialização, pode contribuir para a disseminação da enfermidade em humanos mesmo quando distantes de áreas endêmicas, visto que *Brucella* apresenta elevada capacidade de sobrevivência nesse produto (PACHECO et.al., 1999; PACHECO et.al., 2008; SANTOS e FONSECA, 2012).

Em 2007 um garoto de 14 anos apresentou histórico de febres de até 40°C por 8 semanas, de forma intermitente associado com rigidez, cefaleias, vômitos e apetite diminuído. Ele havia emigrado para o Reino Unido da Jordânia com sua família quando tinha 8 anos e desde então não tinha deixado o Reino Unido. Hemoculturas tomadas na admissão foram negativas em 48 h (BROUGH et al., 2011).

No sexto dia de internamento, novo histórico do paciente foi realizado surgindo o fato que o pai do paciente tinha voltado recentemente de Damasco, Síria, com um grande queijo macio feito de leite de vaca não pasteurizado. Sangue do paciente foi enviado para sorologia de *Brucella* e solicitou-se ao laboratório o prolongamento do período de incubação das hemoculturas negativas realizadas na admissão do paciente. As culturas incubadas apresentaram desenvolvimento de pequenos cocos Gram-negativos, posteriormente confirmados como *Brucella melitensis* (BROUGH et al., 2011).

Não houve casos de brucelose humana em Thassos (Grécia) em 2007 até o início de maio de 2008, quando um número considerável de casos foi notificado ao Departamento de Vigilância Epidemiológica. Em 17 de junho de 2008, foram notificados 55 casos humanos: 53 tinham consumido leite não pasteurizado e/ou de produtos lácteos, oito tinham uma profissão de alto risco (seis proprietários de rebanho e dois açougueiros), e nove tiveram contato sistemático com as ovelhas e/ou cabras (VOROU et al., 2008).

Num total de 50, cinco casos eram residentes permanentes em Thassos e Kavala, respectivamente, na faixa etária de oito a 88 anos. Todos os casos relatados e testados foram positivos para brucelose, oito eram assintomáticos durante o teste positivo, seis dos quais relataram o consumo de leite/laticínios não pasteurizados. É costumeiro entre os moradores de Thassos o consumo de leite não pasteurizado e seus derivados produzidos em torno de seus lares (VOROU et al., 2008).

Após a verificação do surto supracitado, *Brucella melitensis* biovar 3 foi identificada em duas amostras clínicas. Foi revelado que o consumo de queijo produzido localmente era

um fator de risco para a infecção por *Brucella melitensis*. A evidência epidemiológica mostrou que consumo de queijo feito com leite cru de cabra e ovelha de um criador específico da ilha era ligado à ocorrência de brucelose em 79 dos 85 (93%) casos. Os pacientes afirmaram que os queijos tinham sido adquiridos de determinado criador, pois os produtos foram distribuídos pelo mesmo para os consumidores pessoalmente e não por lojas do mercado (KARAGIANNIS et al, 2012).

Em janeiro de 2007, na cidade de Málaga, Espanha, oito pessoas de uma mesma família, contraíram brucelose após o consumo de queijo de cabra oriundo de leite não pasteurizado (COLMENERO et al., 2011).

Um paciente de 34 anos do sexo masculino foi internado na Turquia, queixando-se de quadro febril iniciado há 20 dias e dores no pescoço. Sua ocupação era a pecuária e ele informou ser consumidor de leite e produtos lácteos não pasteurizados, inclusive tendo recentemente comido queijo feito de leite não pasteurizado. Micro-organismos do gênero *Brucella* foram isolados a partir de culturas de sangue, e os testes de Rosa de Bengala e de aglutinação (STA) foram positivos. Em exame de ressonância magnética foi evidenciado um abscesso epidural (EKER et al., 2011).

3.3 Queijo de coalho artesanal

A produção de queijos artesanais no Brasil iniciou-se no período colonial por portugueses, parte da escassa produção leiteira era destinada à fabricação de um queijo frescal, semelhante ao da Serra da Estrela, em Portugal, cuja diferença referia-se ao tipo de material usado para coagulação do leite. Em Portugal, eram utilizados extratos de flores e brotos de cardo, no Brasil, substituídos por estômago seco e salgado de bezerro ou cabrito (CRAVO e COTRIM, 2011).

Largamente fabricado principalmente nos estados do nordeste do Brasil, o queijo de coalho se destaca entre os principais queijos artesanais, de fabricação e consumo comprovadamente incorporados à cultura regional de tradição secular, transferido através de gerações. Entendido como um alimento identitário, é produzido e consumido no espaço geográfico nordestino, seja na forma natural, assado ou frito, além de muito utilizado nas mais diversas preparações culinárias. Tem ultrapassado fronteiras devido à demanda dos migrantes que buscam, no consumo desse produto, uma aproximação com sua Região de origem sendo atualmente muito difundido em todo o território brasileiro ganhando, a cada dia, novos consumidores (NASSU et al. 2006; COSTA, 2009; MENEZES, 2011).



Figura 05: Queijo de coalho. Fonte: folhape.com.br, 2014.

O queijo de coalho é muito apreciado entre os queijos frescos, ou ditos macios. Entende-se por queijo de coalho o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou por outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida que apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0% (BRASIL, 2001).

A maior parte da produção do queijo de coalho é obtida em pequenas e médias queijarias e, apesar da importância econômica e grande popularidade, sua elaboração não conta com boas práticas de fabricação para a oferta de um produto de qualidade. Os problemas observados na manufatura do queijo de coalho são constatados na falta de critérios de qualidade da matéria-prima e na ausência de técnicas adequadas de processamento, fatos que renegam o queijo de coalho ao mercado de produtos de baixa qualidade por não possuir padronização de parâmetros físicos e químicos e perigoso à saúde do consumidor por ser isento de segurança microbiológica (NASSU et al. 2001; CAVALCANTE, 2005; SANTANA et al., 2008; FREITAS FILHO et al., 2009).

Nas últimas décadas, tem-se discutido a necessidade da criação de normativas direcionadas ao setor artesanal, fato relacionado à necessidade de revalorizar a cultura queijeira, agregar valor à produção e oferecer alimentos “seguros”. Produtores, instituições públicas e privadas e gestores públicos têm se mobilizado em defesa da qualidade do queijo de coalho e na elaboração de normativas condizentes a essa pequena produção diante da importância social e econômica que esse queijo possui no Nordeste brasileiro (MENEZES, 2011).

São muitos os defensores dos queijos fabricados com leite cru, desde associações européias de queijos artesanais que defendem a não modificação do “flavor” de seus produtos por tratamentos térmicos e congêneres, aos brasileiros por questões culturais que acreditam que os produtos caseiros ou ditos da roça são mais frescos, nutritivos e saudáveis por supostamente não receberem aditivos (SOUZA, 2005; WEST, 2008).

Sabe-se, no entanto, que a qualidade do produto depende do status sanitário da matéria-prima e das boas práticas aplicadas durante a fabricação, transporte e armazenamento sendo indiscutível que alguns surtos de doenças de origem alimentar têm sido estreitamente relacionados ao consumo de queijo, feito a partir de leite não pasteurizado ou pasteurizado inadequadamente. Inúmeras pesquisas discutem os motivos de permanência desses produtos informais no mercado, destacando questões de ordem cultural, econômica e a falta de fiscalização (SOUZA, 2005; WEST, 2008).

A fabricação de queijos a partir de leite cru é proibida nos Estados Unidos. Já a União Europeia (UE) debateu a questão da segurança de queijo de leite cru e as diretrizes do *Codex Alimentarius*, que fornece padrões para o comércio internacional de queijos, e considera, desde a década de 1990, a pasteurização obrigatória para todos os produtos lácteos com maturação inferior a 60 dias alegando riscos à saúde dos consumidores. Possivelmente pela reconhecida tradição em produzir queijos, a UE propôs alternativas baseadas no sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) para “garantir” a segurança dos consumidores sem, com isso, adicionar a etapa de pasteurização que, segundo eles, descaracterizaria a essência dos queijos tradicionais (DIXON, 2000; CRUZ e MENASCHE, 2011).

Em nosso país, a ignorância quanto à importância das normas impostas pelos sistemas de inspeção oficial para a oferta de alimentos seguros do ponto de vista higiênico sanitário, não se restringe àqueles menos favorecidos, sem acesso à informação. Pelo contrário, chega a ser relatada em periódicos populares pelas ditas “cabeças pensantes” de nosso país em artigos como o do jornalista J.R. Guzzo (2012) que além de ridicularizar o Regulamento Industrial de Inspeção de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e regulamentos técnicos de identidade e qualidade, os compara a itens da ditadura sofrida em nosso país citando que o governo continua a querer controlar a população definindo o que deve ou não ser consumido “dentro dos rigores da lei”.

A regulamentação técnica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determinava, nas últimas décadas, que o leite destinado à produção de queijos

deveria ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente, para assegurar a fosfatase residual negativa, ficando excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001).

Em dezembro de 2012 este cenário começou a mudar. Após anos de discussões por parte dos produtores de queijo artesanal de Minas Gerais e outras regiões do Brasil o MAPA regulamentou, com a publicação da Instrução Normativa nº 57, a produção de queijos artesanais. A norma previa a possibilidade de maturação de queijos por período inferior a 60 dias e definia requisitos para sua produção, garantindo a qualidade do produto e atendendo aos aspectos de sanidade e saúde pública (BRASIL, 2011).

Com a evolução do sistema de inspeção de produtos de origem animal brasileiro, a referida norma foi substituída pela Instrução Normativa nº30 de 2013 onde determina-se 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 (BRASIL, 2013).

A normativa deixa claro que a definição do novo período de maturação dos queijos artesanais será realizada após a avaliação dos estudos pelo órgão estadual e/ou municipal de inspeção industrial e sanitária reconhecidos pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal- SISBI/POA e que para efeito de comércio internacional deverão ser atendidos os requisitos sanitários específicos do país importador (BRASIL, 2013).

Manteve-se a peculiaridade de que a permissão fica restrita a queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controladas para brucelose e tuberculose pelo Órgão Estadual de Defesa Sanitária Animal, no prazo de até três anos a partir da publicação da Instrução Normativa, sem prejuízo das demais obrigações dispostas em legislação específica (BRASIL, 2013).

Especificamente em termos de combate à transmissão da brucelose por leite e derivados em nosso país, o controle é realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através de sua instrução normativa de número 62 de 2012 e, dentre os

diversos aspectos da cadeia produtiva do leite observados, o principal contemplado para este fim é a certificação do controle da brucelose nos rebanhos leiteiros (FRIZZO, 2011).

Reiterou-se que as propriedades rurais onde estão localizadas as queijarias devem descrever e implementar programa de controle de mastite com a realização de exames para detecção de mastite clínica e subclínica, incluindo análise do leite da propriedade em laboratório da Rede Brasileira da Qualidade do Leite - RBQL para composição centesimal, Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total - CBT; Programa de Boas Práticas de Ordenha e de Fabricação, incluindo o controle dos operadores, controle de pragas e transporte adequado do produto até o entreposto; e cloração e controle de potabilidade da água utilizada nas atividades (BRASIL, 2013).

3.4 Identificação da *Brucella*

Até algumas décadas atrás, somente era possível diagnosticar uma enfermidade infecciosa com segurança após o isolamento e a identificação do agente. Porém, no caso da brucelose, trata-se de um processo demorado e oneroso, pois a *Brucella* apresenta crescimento lento (7-14 dias) e sua manipulação exige muita cautela por se tratar de zoonose com alto risco de infecção humana. Qualquer manipulação de *Brucella* viva envolve risco de infecção, sendo exigidos biosseguridade das instalações laboratoriais de nível 3 e pessoal técnico altamente qualificado para lidar com as amostras e inóculos (PACHECO et al., 2008; YU e NIELSEN, 2010).



Figura 06: Inoculação em ágar Thayer Martin de suspensão de queijo de coalho em caldo *Brucella*. Autoria própria, 2011.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem facilitado a detecção de bactérias de crescimento particularmente lento ou difícil, por ser simples, rápida, barata, extremamente sensível e específica, além de facilmente adaptável a altas demandas, requisitos fundamentais na era de guerras biológicas e agroterrorismo que vivenciamos, em que são necessárias ferramentas diagnósticas cada vez mais rápidas, específicas e sensíveis (BRICKER, 2002; GÜLER et al., 2003).

Desde a década de 1990, a PCR é indicada para detecção de espécies de *Brucella* por ter-se mostrado uma técnica mais sensível que as culturas e mais específica que os testes sorológicos (BAILY et al., 1992; MORATA et al., 1999).

Fekete e seus colaboradores (1990) citaram pela primeira vez o sucesso do uso da PCR como método diagnóstico para identificação por *Brucella* a partir da amplificação de um fragmento de 635 bp de um gene da proteína de 43 kDa da membrana externa de *Brucella abortus* estirpe 19, até a atualidade utilizada na imunização de animais.

Em 1992, Baily e colaboradores conseguiram condições de reação e primers adequados para a detecção de *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* e afirmaram que a PCR era capaz de identificar a *Brucella*, mesmo se presente em pequenas quantidades; fato reforçado pelos estudos de Leal-Klevezas e colaboradores em 1995, quando citam que seus primers e ensaios da PCR foram altamente sensíveis e versáteis pois foram capazes de detectar menos de 10 células de *Brucella* spp. em 1 mL de leite com uma variedade de protocolos ou seja, diferentes temperaturas de anelamento, concentrações de primers e MgCl₂.

Ainda em 1995, estudos compararam testes bacteriológicos e sorológicos realizados em amostras de leite para o diagnóstico da brucelose bovina sendo sugerida a substituição do teste do anel de leite pelo teste por PCR, visto a especificidade do primeiro ter sido questionada quando a prevalência da brucelose é baixa (ROMERO et al., 1995).

Só em meados, contudo, de 1996 Rijpens e colaboradores sugeriram o uso da PCR para a confirmação de culturas de *Brucella* spp. eliminando, assim, demorados testes bioquímicos e sorológicos. Ao mesmo tempo, Da Costa (1996), juntamente com seus colaboradores, após extração de DNA de todas as estirpes de referência e de vacinas de *Brucella* e sua amplificação por PCR com especificidade dos produtos amplificados confirmada pelo uso do DNA de 98 micro-organismos não *Brucella*, afirmaram ser a PCR uma técnica robusta, altamente específica que deveria ser aplicada no diagnóstico da brucelose.

Desde então, numerosos ensaios baseados em PCR têm sido desenvolvidos para a identificação de *Brucella* objetivando melhorar a capacidade de diagnóstico. Na fase inicial dos estudos, as análises se limitavam à identificação do DNA obtido da cultura dos microorganismos. Mas, sabendo-se que é mais efetiva a detecção direta do material sob suspeita de contaminação, focou-se na busca por técnicas mais apuradas para remoção de inibidores da polimerase, sem dúvida a maior dificuldade encontrada na implementação dos protocolos. Estudos como o de Romero e Lopez-Goñi (1999) foram fundamentais para a resolução desse inconveniente e a PCR pôde, finalmente, ser realizada diretamente em materiais como tecidos, sangue, leite, secreções nasais, sêmen e produtos alimentícios, principalmente leite e queijos moles (BRICKER, 2002).

O método de PCR foi aprimorado para a detecção de *Brucella* spp. diretamente em queijos, após a superação de problemas com a exclusão de inibidores. A técnica mostrou-se simples com boa sensibilidade e especificidade; rápida, menos dispendiosa que análises bacteriológicas convencionais, além de não ser afetada pela presença de outros microorganismos presentes na amostra. Destacando-se, assim, como notável na análise de queijos, do ponto de vista epidemiológico, por ser um teste bastante útil para determinação da qualidade sanitária deste alimento e sua matéria-prima (SERPE et al., 1999; TANTILLO et al., 2001).

Em 2011, Colmenero e seus colaboradores analisaram, pela primeira vez, o rendimento do diagnóstico através da reação da polimerase em cadeia em tempo real de um surto brucelose que acometeu uma família após o consumo de queijo de cabra produzido a partir de leite não pasteurizado. A referida técnica identificou corretamente todos os casos sintomáticos.

Pesquisas para uso do método de PCR em produtos lácteos continuam em andamento. Por se constituírem em um material complexo pelo elevado teor de inibidores da taq polimerase, comemora-se o sucesso do uso da PCR semi-nested desenvolvido para detectar *Brucella* spp. em queijo macio, evidenciando que a técnica pode ser utilizada na rotina para monitorar *Brucella* na cadeia produtiva do queijo com sensibilidade superior à PCR comum (TANTILLO et al., 2003).

3.5 A cidade de Parnaíba

A cidade surgiu sob a denominação de Parnaíba segundo uns, do desejo dos primeiros exploradores do Piauí de homenagear o então distrito Paulista de Parnaíba, e, segundo outros,

da palavra tupi que significa "grande rio não navegável". Depois de 1761, iniciou-se o seu desenvolvimento. Funcionava, por essa época no local, uma charqueada de propriedade de Domingos Dias da Silva, português, fundador do Porto das Barcas e que foi o pioneiro da região, principalmente nos setores comercial e agrícola (IBGE, 2013).

A estrutura de exportação fundada pelas charqueadas permitiu a comercialização de outros produtos, originados da agricultura e da atividade extrativista, que passavam a ser requisitados no comércio internacional, mais precisamente para a indústria europeia em plena revolução. Artigos como o algodão, o couro para a fabricação de correias, calçados e cintos, dentre outros, a borracha, a cera de carnaúba e as resinas de jatobá e do angico, coco da palmeira babaçu vinham do sertão via rio Parnaíba para o porto Salgado (REGO, 2010).

Atualmente, a cidade possui uma população de mais de 150 mil habitantes. É, dessa forma, o segundo município mais populoso do Estado, perdendo apenas para a capital Teresina. Localiza-se na bacia hidrográfica do Rio Parnaíba e é cortada por esse Rio, que se divide em vários braços, formando o famoso Delta do Parnaíba, o único em mar aberto das Américas e o terceiro maior do mundo, só perdendo para o do Nilo, no Egito e o do Mekong no sudeste asiático. Distancia-se da capital, Teresina, cerca de 339 km (PREFEITURA DE PARNAÍBA, 2013).

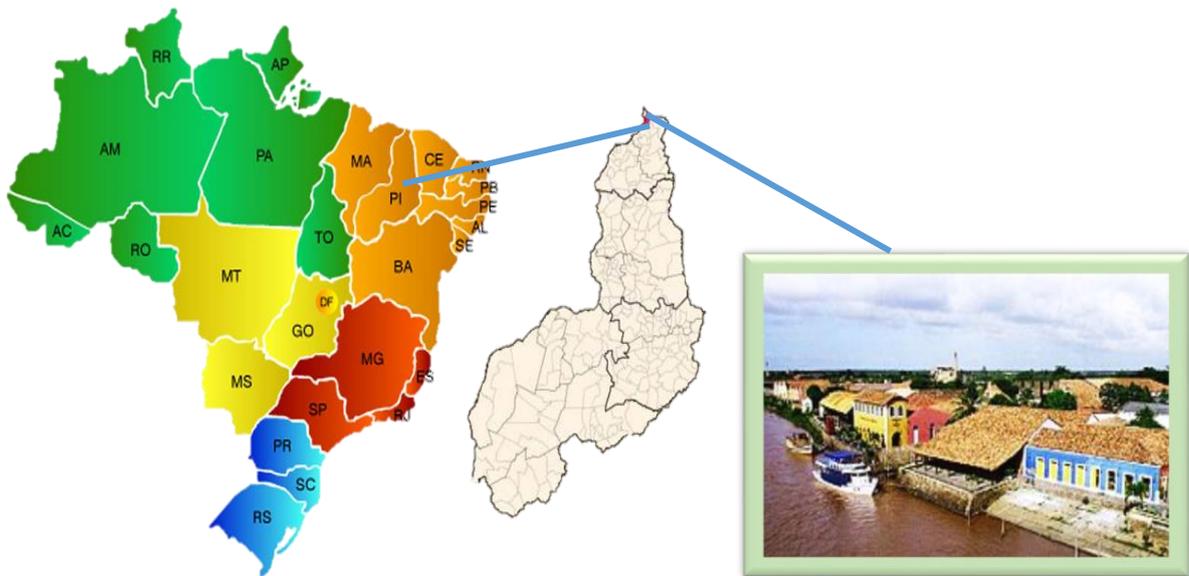


Figura 07: Brasil, Piauí e cidade de Parnaíba, respectivamente. Fontes: sistema.psc.org.br, parnaibashopping.com.br, wikipedia.com.br, 2014.

No estado do Piauí, a produtividade leiteira encontra-se no 22º lugar do ranking nacional sendo o município de Parnaíba o maior produtor de leite da bacia do rio Parnaíba, participando com 42,9% na renda familiar dos 156 produtores (SEBRAE/PI, 2005; CASTRO et al., 2012).

Os dados da cadeia produtiva do leite na cidade de Parnaíba, estão relacionados na tabela 02:

Tabela 02: Valores da cadeia produtiva do leite na cidade de Parnaíba-PI.

Descrição	Valores	
Bovinos - Número de estabelecimentos agropecuários	249	Unidades
Espécie de efetivo - Bovinos - Número de cabeças	6.450	Cabeças
Número de estabelecimentos agropecuários que produziram leite no ano	156	Unidades
Vacas ordenhadas no ano nos estabelecimentos agropecuários	1.720	Cabeças
Quantidade produzida de leite de vaca no ano nos estabelecimentos agropecuários	4.840	Mil litros
Valor da produção de leite de vaca no ano nos estabelecimentos agropecuários	3.322	Mil reais
Quantidade produzida de leite de vaca cru beneficiado no ano nos estabelecimentos agropecuários	-	Mil litros
Número de estabelecimentos agropecuários que venderam leite pasteurizado no ano	-	Unidades
Número de estabelecimentos agropecuários que venderam leite cru no ano	125	Unidades
Quantidade vendida no ano de leite de vaca cru nos estabelecimentos agropecuários	4.434	Mil litros

Fonte: Censo Agropecuário, IBGE, 2006.

De toda a produção, 56,0% dos produtores de leite pasteurizam sua produção, sendo 32,3% na Cooperativa; 12,4% na indústria privada; e 11,3% em outro local. Desta produção, são obtidos, em média, 110 Kg de queijo/dia (SEBRAE/PI, 2005).

Grande parte da produção de leite (37,6%), contudo, é vendida “in natura” ao consumidor ou na forma de queijos de coalho produzidos sem a prévia pasteurização do leite pois, segundo os produtores locais, o aquecimento do leite compromete a consistência da massa; tal postura é fator de risco para disseminação de zoonoses (CASTRO et al., 2012).

Nem todo o queijo comercializado na cidade de Parnaíba tem origem nesse município. Segundo o relato de Araújo et al. (2011) o município de Luiz Correia, que faz limite a oeste com Parnaíba, é responsável por uma fatia desse mercado. O queijo oriundo daquele município é produzido nas comunidades de Brejinho do Meio/N.S. de Fátima, e é vendido no comércio e nas feiras livres dos municípios de Parnaíba e Luís Correia-PI e Chaval-CE, onde pode-se encontrar queijos dos mais variados tamanhos entre 1 a 6 kg, e das mais variadas formas, redondos, quadrados e retangulares.

O processo de produção de queijo de coalho nas comunidades supra citadas é totalmente artesanal e os problemas percorrem toda a cadeia produtiva. A ordenha não apresenta os cuidados de higiene, tampouco cuida-se da conservação e transporte da matéria-prima. Na fabricação do queijo propriamente dita, os riscos estão relacionados com a falta de higiene na manipulação da matéria-prima e uso de utensílios não apropriados tais como prensas artesanais feitas de madeira, ferro, canos de PVC e pedra, que apresentam as mais variadas formas e tamanhos. Já no transporte, o manuseio do queijo não conta com boas práticas de higiene e não são usadas embalagens. Finalmente, na comercialização, observa-se o armazenamento impróprio (ARAÚJO et al., 2011).

Apesar de relatórios de instituições como o SEBRAE, reconhecidas nacionalmente, afirmarem que de modo geral, a bacia leiteira de Parnaíba apresenta bons índices de controle sanitário do rebanho com assistência técnica na referida bacia onde 70,7% dos produtores contam com assistência técnica; tendo, desse total, 93,3% assistência esporádica e 6,7% assistência permanente, refletidos no que se refere às práticas higiênicas, visualizado em números na realização do teste da caneca telada (80,9%) e no de mastite (19,4%) (SEBRAE/PI, 2005), observa-se que ainda há muito trabalho a ser realizado.

O Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovinas - PECEBT do Piauí que visa baixar a prevalência e a incidência dessas duas doenças no Estado e agregar valor ao produto de origem animal comercializado instituindo a vacinação obrigatória de bezerras de 3 a 8 meses de idade, o controle do trânsito de animais de outros Estados para o Piauí e dentro do próprio Estado e a certificação de propriedades livres e monitoradas com a adesão voluntária de produtores (ADAPI, 2013).

Até a presente data números obtidos em relatórios da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Piauí (ADAPI) nos mostra uma tentativa e não a implementação efetiva do PNCEBT. Até abril de 2012, o município de Parnaíba contava com sete Médicos Veterinários habilitados para o exame de brucelose bovina. O número de registros de bezerras vacinadas subiu de zero no ano de 2010 para 70 em 2011 caindo novamente em 2012 com apenas 44 animais vacinados (ADAPI, 2013).



4 Artigos Científicos

*4.1 Artigo Científico a ser Submetido ao
Brazilian Journal of Microbiology*

Isolamento da *Brucella* spp. em queijos de coalho produzido com leite cru

1 **Suely Santos Bezerra¹; Nair Silva Cavalcanti de Lira⁴; Pomy de Cássia Peixoto Kim²;**
2 **Francisco José de Seixas Santos³ e Emiko Shinozaki Mendes²**
3

4 ¹ – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, *Campus* Barreiros –
5 susbezerra@gmail.com,

6 ² – Universidade Federal Rural de Pernambuco - esmendes@yahoo.com.br,
7 kim_pomy@hotmail.com

8 ³ – EMBRAPA Meio-Norte - francisco.seixas@embrapa.br
9

10 ⁴ – Universidade Federal do Piauí – CPCE – naircl@hotmail.com
11

12 **Resumo**

13
14 Doenças de origem alimentar comumente estão associadas ao consumo de produtos de origem
15 animal, tais como o leite e seus derivados. Dentre esses, destacam-se os queijos de coalho
16 que, por serem fabricados a partir de leite cru, são fator de risco para ocorrência de
17 toxinfecções alimentares e atualmente incriminados, por diversos estudos, como agentes de
18 zoonoses. Dado o fato de a brucelose ser uma das principais zoonoses que acometem bovinos
19 leiteiros, objetivou-se realizar o isolamento de bactérias gênero *Brucella* em 30 amostras de
20 queijos de coalho produzidos com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba-PI. As
21 amostras foram adquiridas no período de novembro de 2011 a janeiro de 2012. Para o
22 isolamento do agente utilizou-se a microbiologia convencional, utilizando o ágar *Brucella* e
23 Thayer Martin, suplementados ou não de mistura de antibióticos e um antifúngico; com
24 posterior confirmação em nível de gênero pelo método da reação da polimerase em cadeia
25 (PCR). A bactéria foi isolada de seis amostras e cada isolado teve seu gênero confirmado pela
26 PCR, indicando a possibilidade dos queijos de coalho comercializados na cidade de Parnaíba
27 serem veículo em potencial de brucelose para os consumidores, o que remete à necessidade do
28 acompanhamento constante da cadeia produtiva de forma a evitar riscos à saúde pública pelo
29 controle efetivo das fontes de contaminação.
30

31 **Palavras-chave:** Queijo de coalho, *Brucella*, zoonose.
32

33 **Introdução**

34 Entende-se por queijo de coalho “o produto obtido por coagulação do leite
35 pasteurizado por meio do coalho ou por outras enzimas coagulantes apropriadas,

1 complementadas ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado
2 normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação”. É um queijo de média a alta umidade, de
3 massa semi-cozida ou cozida, que apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável
4 entre 35,0% e 60,0% (Brasil, 2001).

5 Queijos de coalho elaborados artesanalmente são produzidos com leite cru, na maioria
6 das vezes não possuem padronização e os locais onde são rotineiramente fabricados carecem
7 de condições higiênico-sanitárias adequadas à manipulação de alimentos, o que propicia a
8 veiculação de patógenos através desses produtos (Nassu et al. 2001; Cavalcante, 2005;
9 Santana et al., 2008; Freitas Filho et al., 2009).

10 Considerando a possibilidade de a matéria-prima estar contaminada e sabendo-se que
11 não existe nenhuma etapa da produção que elimine ou reduza o perigo, relacionam-se de
12 forma estreita surtos de doenças de origem alimentar com o consumo de queijos fabricados
13 com leite cru, classificando-os como “alimentos arriscados” e associados à veiculação de
14 *Brucella* (West, 2008).

15 Bactérias do gênero *Brucella* apresentam elevada capacidade de sobrevivência nesses
16 produtos, cujo transporte às zonas urbanas, como parte do processo de comercialização, pode
17 contribuir para a proliferação e consequente disseminação da zoonose em humanos (Pacheco
18 et.al., 2008; Pacheco, 1999).

19 Diante do exposto, objetivou-se averiguar a presença de bactérias do gênero *Brucella*
20 em queijos de coalho produzidos com leite cru comercializados na cidade de Parnaíba-PI.

21

22

Material e métodos

23 Realizou-se um levantamento dos pontos de comercialização de queijos de coalho na
24 cidade de Parnaíba-PI. Dentre supermercados, mercadinhos, padarias, açougue, mercados
25 públicos e “bancas”, 66 pontos de venda foram identificados e deles 30 escolhidos de forma

1 aleatória para a coleta de amostras de queijos de coalho produzidos com leite cru no período
2 de novembro de 2011 a janeiro de 2012.

3 As amostras acondicionadas em caixas isotérmicas com baterias de gelo reciclável,
4 foram remetidas em duplicatas ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento
5 de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

6 As análises microbiológicas tradicionais foram realizadas seguindo-se o método citado
7 por Miyashiro (2004), modificado pela inclusão do Ágar Thayer Martin, que é comumente
8 utilizado para isolamento de *Brucella* a partir de sangue e tecidos, além do uso de
9 suplementos antibióticos e antifúngico comerciais *Brucella*[®] (sulfato de polimixina B: 2500
10 IU/0,5L, bacitracina: 12500 IU/0,5L, nistatina: 50000IU/0,5L, cicloheximida: 50.00 mg/0,5L,
11 ácido nalidixico: 2.50 mg/0,5L e vancomicina: 2.50 mg/0,5L) e V.C.N.T.[®] (vancomicina: 1.50
12 mg/0,5L, sulfonado metano colistina: 3.75 mg/0,5L, trimetoprim: 2.50 mg/0,5L e nistatina:
13 6250 unidades/0,5L).

14 Alíquotas de 25 g das amostras foram suspensas em 100 mL de caldo *Brucella*[®] e
15 homogeneizadas em Stomacher por 60 segundos, sendo semeados 10 µL desta suspensão em
16 placas (em duplicata) em quatro tratamentos como descrito na tabela 01:

17

18 **Tabela 01:** Tratamentos para inoculação de suspensão de caldo *Brucella* em ágar.

Tratamento	Ágar utilizado	Sangue de carneiro desfibrinado (%p/v)	Suplemento antibiótico/antifúngico
1	<i>Brucella</i>	5	<i>Brucella</i>
2	<i>Brucella</i>	5	Não
3	Thayer Martin	10	V.C.N.T.
4	Thayer Martin	10	Não

19

20 Uma placa de cada tratamento foi incubada a 37°C em aerobiose e outra em
21 microaerofilia por até 14 dias. As colônias morfológicamente suspeitas foram identificadas
22 macroscopicamente e por coloração de Gram, seguindo as orientações de Alton (1975) e

1 estocadas a -80°C em tubos de polipropileno contendo água ultra pura, para posterior
2 confirmação de gênero pelo método de reação da polimerase em cadeia (PCR).

3 As análises da PCR foram realizadas a partir do material estocado a -20°C, de onde
4 alíquotas de 200 µL foram submetidas à extração de DNA após o descongelamento,
5 utilizando o protocolo para bactérias Gram negativas do fabricante do “Kit”, seguindo-se o
6 método citado por Miyashiro (2004), modificado.

7 Os *primers* de eleição foram aqueles que têm por alvo região 16S-23S do rRNA para
8 *Brucella* spp.: ITS66: ACATAGATCGCAGGCCAGTCA e ITS279:
9 AGATACCGACGCAAACGCTAC. Para a reação de PCR utilizou-se mix, água ultrapura
10 como controle negativo e DNA de cepa de *Brucella ovis* (Reo 198), cedida pelo Instituto de
11 Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, como controle positivo.

12 A PCR foi realizada utilizando-se o método descrito por Alves et al. (2010). Após a
13 desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, o perfil de PCR foi criado da seguinte forma: 30s
14 de desnaturação molde a 95 °C, 30 s de emparelhamento a 62 °C e 30 s de extensão do *primer*
15 a 72 °C, para um total de 40 ciclos, com uma extensão final a 72 °C durante 5 min. Os
16 produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) em cuba
17 horizontal, com tampão de corrida TAE 1x, corados com blue green e padrão de peso
18 molecular de 100 pb. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e comparadas com o
19 padrão de peso molecular, sendo consideradas positivas aquelas com peso molecular
20 aproximado de 214 pb.

21

22

Resultados e discussão

23 Das 30 amostras em duplicata analisadas, isolaram-se colônias suspeitas de 11, todas
24 cultivadas em ágar Thayer Martin suplementado ou não por antibióticos e procedentes tanto
25 das incubações realizadas sob aerobiose, quanto das sob microaerofilia. Dessas, sete foram

1 confirmadas por PCR como bactérias do gênero *Brucella*, procedentes de seis amostras
2 (tabela 02).

3

4 **Tabela 02:** Resultados averiguação de presença de bactérias do gênero *Brucella* em queijos de coalho
5 produzidos com leite cru comercializados na cidade de Parnaíba-PI.

Amostras que apresentaram colônias suspeitas, testadas por PCR	Amostras confirmadas como do gênero <i>Brucella</i>
03	X
04	
05	
08	
09	
10	X
11	
14	X
24	X
25	X
28	X

6

7 *Brucella* é um micro-organismo fastidioso e que requer para seu isolamento meios de
8 cultivo extremamente ricos formulados exclusivamente com esse intuito, tempo
9 extremamente longo de incubação, além de alto investimento financeiro. Devido a essas
10 especificidades, muitas vezes não é possível isolar essa bactéria, dada a precária
11 competitividade perante outros micro-organismos, meios de cultivo pouco eficientes ou
12 ausência de recursos financeiros.

13 Provavelmente, devido às dificuldades apontadas para o isolamento da *Brucella*,
14 diversos pesquisadores não obtiveram sucesso ao tentar isolar esse micro-organismo em
15 queijos. Inicialmente, acreditamos que o meio de cultivo utilizado fosse fator determinante
16 para tal situação (como explicitado na tabela 03). Contudo, se considerarmos as orientações
17 para isolamento a partir de material clínico, segundo a Agência Nacional de Vigilância
18 Sanitária - ANVISA (2004), brucelas desenvolvem-se bem em ágar sangue, ágar chocolate,
19 Tripticase Soy Agar e ágar *Brucella* e, ainda, em frascos de hemocultura.

20

1 **Tabela 03:** Tentativas de isolamento de *Brucella* por microbiologia convencional em queijos.

Autor/ano	Local	Espécie de <i>Brucella</i> pesquisada	Número de amostras/ Tipo de queijo	Ágar utilizado	Isolamento do micro-organismo
Kobayashi (2012)	São Paulo Brasil	<i>Brucella</i> spp.	38 amostras de queijos artesanais e cinco amostras de queijos produzidos sob SIF*	<i>Brucella</i>	Não
Nascimento et al. (2002)	Rio de Janeiro Brasil	<i>Brucella abortus</i>	46 amostras de queijo tipo minas frescal, de 23 marcas com e sem SIF*	<i>Brucella</i>	Não
Kasimoglu (2002)	Kirikkale Turquia	<i>Brucella</i> spp.	35 amostras de queijos produzidos com leite de vaca cru	Farrel	Não
Miyashiro (2004)	Minas Gerais Brasil	<i>Brucella abortus</i>	49 amostras de queijo minas frescal e 18 de queijos meia cura clandestinos	<i>Brucella</i>	Não
Miyashiro (2004)	São Paulo Brasil	<i>Brucella abortus</i>	92 de minas frescal e 33 de meia cura apreendidos	<i>Brucella</i>	Não
Zaffari (2005)	Litoral do Rio Grande do Sul Brasil	<i>Brucella</i> spp.	80 amostras de queijos artesanais	<i>Brucella</i>	Não

2 **Legenda:** *SIF: Serviço de Inspeção Federal.

3

4 Apesar de não ter isolado *Brucella* spp. de queijos produzidos com leite de vaca cru,
5 Kasimoglu (2002), isolou *B. melitensis* a partir de 5 (14,2%) das 35 amostras de queijos
6 elaborados com leite de ovelhas utilizando a mesma técnica que empregava ágar Farrel.

7 Dessa forma, segue o questionamento do fator de maior interferência na dificuldade de
8 sucesso no isolamento de *Brucella* a partir de queijos, ressaltando, contudo, que Zaffari
9 (2005) atribuiu o não isolamento à presença de microbiota competidora presente nas amostras.

10 Fica, ainda, o questionamento, se as vacas de que foi oriunda a matéria-prima, eram,
11 de fato, negativas para brucelose.

12 Ao avaliar por microbiologia convencional a ocorrência de *Brucella* em 20 amostras
13 de queijo branco macio elaborado com leite de vaca cru, comercializados em Damietta, Egito,
14 Abdullah e seus colaboradores (2007) isolaram *Brucella* em duas delas, esses autores não

1 informaram, em sua metodologia, os meios de cultivo utilizados, permanecendo não
2 identificado o fator que levou ao sucesso do isolamento.

3 Akbarmehr (2011) também isolou *Brucella* em 22 de 1000 amostras de queijos
4 produzidos com leite não pasteurizado comercializados na cidade de Sarab, Iran, utilizando o
5 meio de cultivo Trypticase Soy Agar, suplementado com o antibiótico cicloheximida. Nesse
6 caso em particular acreditamos que o sucesso no isolamento do micro-organismo deveu-se às
7 altas cargas iniciais e/ou uso de antimicrobiano, tal como realizado em nosso estudo.

8 Segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Piauí (ADAPI, 2013), o número de
9 animais vacinados contra a brucelose em todo o Estado subiu de 566 em 2010 para 3795 em
10 2011. Mesmo com esse expressivo aumento, o número de animais vacinados ainda é baixo,
11 para um rebanho em que 7560 cabeças foram examinadas durante o Programa Estadual de
12 Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovinas. O fato se agrava quando são
13 contabilizados que na cidade de Parnaíba somente 70 bezerras foram vacinadas em todo o ano
14 de 2011 e que não se tem informações oficiais a cerca do status vacinal dos animais antes das
15 datas citadas. Esse, provavelmente, é um dos fatores preponderantes para o alto percentual de
16 amostras positivas verificado no presente estudo, responsável pelo primeiro isolamento por
17 microbiologia convencional de *Brucella* spp. em queijos no Brasil.

18 A situação da bovinocultura de leite em municípios que são sabidamente fornecedores
19 de queijos de coalho para o comércio de Parnaíba pode ser ilustrada pelo quadro gerado pela
20 Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba – CODEVASF
21 em seu Plano de Ação para o Desenvolvimento Integrado da Bacia do Parnaíba, PLANAP
22 CODEVASF (Brasil, 2006), no qual essa atividade é classificada como estagnada. A falta de
23 um programa de controle e erradicação da brucelose e tuberculose, além da ausência de
24 estímulo e de investimentos na atividade pode ser a resposta para os baixos índices de
25 vacinação praticados contra a brucelose animal, não só no município de Parnaíba, mas

1 também naqueles que fazem parte da bacia do rio Parnaíba, que abrange 222 municípios do
2 estado do Piauí e 36 do Maranhão, fato que enfraquece a sanidade dos rebanhos e favorece a
3 disseminação de brucelose entre animais e humanos, além de sua veiculação através de
4 derivados lácteos e outros produtos de origem animal.

5 O aparente abandono dessa atividade fica ainda mais evidente quando observarmos os
6 informes mensais de ocorrências de doenças de interesse da Defesa Sanitária Animal do
7 estado do Piauí, onde durante os três meses nos quais foram coletadas amostras não foi
8 registrada qualquer atividade profilática relativa à brucelose bovina. Contudo, a hipótese de
9 altos índices de contaminação de amostras devido ao comprometimento da sanidade do
10 rebanho é enfraquecida, visto não ter sido registrado nenhum caso de brucelose bovina no
11 referido período, provavelmente por não ter sido realizado exame contra a brucelose nesses
12 animais (ADAPI, 2014).

13 Carneiro et al. (2006), ao caracterizarem a eficiência produtiva de rebanhos bovinos
14 leiteiros participantes do programa INFOLEITE no Baixo Parnaíba, utilizando 5.894 registros
15 de vacas leiteiras, obtidos em 25 fazendas cadastradas no Programa INFOLEITE da Prefeitura
16 Municipal de Parnaíba, citaram que o percentual de animais vacinados contra brucelose foi de
17 78,6%. Contudo, não conseguiram determinar se o manejo sanitário em si provocou perdas na
18 eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos avaliados, indicando a necessidade da
19 melhora de práticas de manejo e uma forma geral.

20

21

Conclusões

- 22 1. O meio de cultivo Thayer Martin, mostrou-se eficiente no isolamento de *Brucella* spp.
23 em amostras de queijos de coalho;
- 24 2. Queijos de coalho elaborados com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba,
25 podem ser causa da transmissão do agente da brucelose para humanos;

- 1 3. Faz-se necessário acompanhamento em toda a cadeia produtiva de queijos de coalho,
2 através do controle efetivo das fontes de infecção, de forma a evitar riscos à saúde
3 pública.

4 Referências

- 5 1. Abdullah, M.I.M.; Dawoud, A.S.; Bazalou, M.S. (2007) Occurrence of *Brucella* in some
6 unheattreated dairy products in Damietta governorate regarding its health importance.
7 Najran University. <http://dspace.nu.edu.sa/xmlui/handle/123456789/20>.
- 8 2. ADAPI - Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Piauí (2013) Relatório do
9 Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovinas –
10 PECEBT, 2012.
- 11 3. ADAPI - Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Piauí (2014) Informe mensal de
12 ocorrências de doenças e atividades profiláticas – Piauí. Disponível em:
13 <<http://www.adapi.pi.gov.br/vigilancia-epidemiologica/boletim-epidemiologico>> Acesso
14 em: 05/02/14.
- 15 4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2004) Manual de
16 Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Edição
17 comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia
18 Hospitalar. Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004 - Versão Preliminar.
- 19 5. Akbarmehr, J. (2011) The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local
20 cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. African Journal of
21 Microbiology Research 5(12), 1500-1503.
- 22 6. Alves, C. J.; Figueiredo, S. M. De; Azevedo, S. S. De; Clementino, I.J.; et al. (2010)
23 Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast region of Brazil.
24 Brazilian Journal of Microbiology, 41(2), 365-367.
- 25 7. Alton, G. G., Jones, L. M., Pietz, D. E. (Eds.). (1975) Laboratory techniques in
26 brucellosis. Second ed. World Health Organisation, Geneva.
- 27 8. Brasil (2001) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos
28 Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga de Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo
29 de Coalho e Queijo de Manteiga. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001.
- 30 9. Brasil (2006) Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba –
31 CODEVASF Plano de Ação para o Desenvolvimento Integrado da Bacia do Parnaíba,
32 PLANAP : síntese executiva : Território Vales dos rios Piauí e Itaueiras / Companhia de
33 Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba – CODEVASF. –
34 Brasília, DF : TDA Desenhos & Arte Ltda. 68p. : il. – v.9.
- 35 10. Carneiro, T.S.; et al. (2006) Caracterização e eficiência produtiva de rebanhos bovinos
36 leiteiros Participantes do Programa INFOLEITE no Baixo Parnaíba, Piauí. Revista
37 Científica de Produção Animal, v.8, n.2.

- 1 11. Cavalcante, J. F. M. (2005) Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo
2 coalho com segurança alimentar. 182 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de
3 Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG).
- 4 12. Freitas Filho, J.R. et al. (2009) Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal
5 fabricado em Jucati – PE. *Revista Eletrônica de Extensão*, v. 6, n. 8, p.35-49.
- 6 13. Kasimoglu, A. (2002) Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white
7 cheese in Kirikkale. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr* 3 (3): 245-50.
- 8 14. Kobayashi, P. DE F. (2012). Monitoramento dos principais agentes zoonóticos em leite e
9 seus derivados de origem clandestina, provenientes de animais criados às margens do Rio
10 Tietê. São Paulo, Brasil 61p. (M.Sc. Dissertation Programa de Pós-Graduação Segurança
11 Alimentar e Sanidade no Agroecossistema. Instituto Biológico (São Paulo).
- 12 15. Miyashiro, S. (2004) Presença de DNA de *Brucella abortus* em produtos lácteos
13 clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da
14 polimerase em cadeia (PCR) São Paulo, Brasil, 75p. (M.Sc. Dissertation Faculdade de
15 Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.
16 USP).
- 17 16. Nascimento, M.G.F.; Cunha, C.P.; Jesus, V.L.T.; Lignon, G.B.; Nascimento, E.R. (2002)
18 Levantamento de *Brucella abortus* em queijos Minas Frescal comercializados no Estado
19 do Rio de Janeiro. *Rev Hig Alim* 16(101):63-66.
- 20 17. Nassu, R.T.; Araújo, R.S.; Borges, M.F.; et al. (2001) Diagnóstico das condições de
21 processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza:
22 Embrapa Agroindústria Tropical.
- 23 18. Pacheco, A. M.; Freitas, E. B.; Bérغامo, M.; Mariano, R. S. (2008) A importância da
24 brucelose bovina na saúde pública. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*,
25 ano VI – n.11.
- 26 19. Pacheco, H.A. (1999) Identificación de factores de riesgo de brucelosis como zoonosis en
27 la república mexicana.
28 [http://www.docstoc.com/docs/20552914/IDENTIFICACION-DE-FACTORES-](http://www.docstoc.com/docs/20552914/IDENTIFICACION-DE-FACTORES-DE-RIESGO-DE-BRUCÉLOSIS-COMO-ZOONOSIS)
29 [DE-RIESGO-DE-BRUCÉLOSIS-COMO-ZOONOSIS.](http://www.docstoc.com/docs/20552914/IDENTIFICACION-DE-FACTORES-DE-RIESGO-DE-BRUCÉLOSIS-COMO-ZOONOSIS)
- 30 20. Santana, R. F. et al. (2008) Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em
31 Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais -
32 Brasil, v. 60, n. 6, p. 1517-1522.
- 33 21. West, H.G. (2008) Food fears and raw-milk cheese. *Appetite* 51, 25–29.
- 34 22. Zaffari, C.B. (2005) Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp.
35 em queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do Rio Grande do Sul. Porto
36 Alegre, Brasil, 100p. (M.Sc. Dissertation Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-
37 graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFRGS).

*4.2 Artigo Científico a ser Submetido ao
Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*

1 **Detecção da *Brucella* spp. em queijos de coalho**
2 **produzidos com leite cru pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR)**

3
4 ***Detection of Brucella spp. in artisanal cheese curd, using the technique of polymerase***
5 ***chain reaction***
6

7 **S.S. Bezerra^{1*}; P.C.P. Kim¹; K.N.C. Castro²; E.S. Mendes¹**

8 ¹ – Universidade Federal Rural de Pernambuco

9 ² – EMBRAPA Meio-Norte

10
11 **Resumo**

12 Largamente fabricado principalmente nos Estados do Nordeste do Brasil, o queijo de coalho
13 se destaca entre os principais queijos artesanais produzidos com leite cru e notadamente um
14 possível veículo de contaminação humana por *Brucella* spp. Por se tratar de um micro-
15 organismo fastidioso, o isolamento desse agente de zoonose por métodos microbiológicos
16 convencionais é difícil, caro, demorado e, na maioria dos casos não se consegue isolar o
17 micro-organismo. Desta forma, objetivou-se detectar *Brucella* spp. em queijos de coalho
18 elaborados com leite cru, pela técnica da PCR. Um total de 30 amostras de queijo de coalho
19 produzidos com leite cru foi adquirido em diversos pontos de venda da cidade de Parnaíba-PI
20 e analisadas pela técnica da PCR. Sete amostras foram positivas (23,33%), comprovando a
21 eficácia do método de PCR na detecção de *Brucella* spp. em queijo de coalho, com elevada
22 proporção de positividade, de forma rápida e precisa. Contudo, para tornar possível a sua
23 indicação de uso pelos órgãos de inspeção, para o controle em toda a cadeia produtiva faz-se
24 necessário o aprimoramento de técnicas de PCR multiplex para esse produto, a fim de
25 distinguir numa única análise, espécies de *Brucella*, incluindo aquelas de origem vacinal.

26
27 **Palavras-chave:** queijo de coalho, *Brucella* spp., zoonose, PCR.

28
29 **Abstract**

30 Largely made mainly in the states of Brazil Northeast, the cheese curd stands out among the
31 major artisanal cheeses made with raw milk and especially a possible vehicle of human
32 contamination by *Brucella* spp. Because it is a very hard microorganism isolation, this
33 zoonotic agent by conventional microbiological methods is difficult, expensive, time
34 consuming and, in most cases you can't isolate the microorganism. Thus, we aimed to search
35 the detection of *Brucella* spp. rennet in cheeses made with raw milk by PCR. A total of 30
36 samples of curd cheese produced from raw milk was purchased at various outlets of the city
37 of Parnaíba –PI, Brazil, and analyzed by PCR. Seven samples were positive (23.33 %),
38 proving the effectiveness of the PCR method for the detection of *Brucella* spp. in farmhouse
39 cheese, with a high proportion of positivity, quickly and accurately. However, to make its
40 applicability to the inspection organs to control the entire production chain as possible it is
41 necessary to improve techniques of multiplex PCR for that product in order to define in a
42 single analysis, *Brucella* species, including those vaccine strains.

43
44 **Keywords:** cheese, bacteria, zoonosis, PCR.
45

46 **Introdução**

1 Queijos de coalho elaborados artesanalmente com leite cru são consumidos nos
2 Estados nordestinos, seja na forma natural, assada ou frita, além de muito utilizado em
3 preparações culinárias e a cada dia ganha novos consumidores (Nassu et al., 2006).

4 A maior parte da produção do queijo de coalho utiliza o leite cru e culturalmente essa
5 produção é realizada em pequenas e médias queijarias que não contam com qualquer
6 orientação acerca de boas práticas de fabricação, para a oferta de um produto de qualidade e
7 seguro. Os problemas observados na manufatura do queijo de coalho vão desde a falta de
8 critérios de qualidade da matéria-prima até a ausência de técnicas adequadas de
9 processamento, fazendo com que sejam distribuídos no mercado produtos de baixa qualidade,
10 que não apresentam padronização de parâmetros físicos e químicos e são perigosos à saúde do
11 consumidor por não oferecerem segurança microbiológica (Nassu et al. 2001; Santana et al.,
12 2008; Freitas Filho et al., 2009).

13 Segundo Langoni et. al. (2011), não somente o leite cru contaminado, mas também
14 seus derivados e queijos frescos, têm sido a principal fonte de infecção nos casos de brucelose
15 em humanos, visto que a *Brucella* pode sobreviver nesses alimentos de duas semanas a três
16 meses, nos estágios de maturação e de acidificação. Em todo o mundo, parte dos novos casos
17 de contaminação humana por *Brucella* spp. são associados ao consumo de queijo produzido
18 com leite cru (Carvalho et al. 1995).

19 A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem facilitado a detecção de bactérias de
20 crescimento particularmente lento ou difícil, por ser simples, rápida, barata e atender
21 facilmente às altas demandas na necessidade de ferramentas diagnósticas cada vez mais
22 rápidas, específicas e sensíveis (Bricker, 2002). Por isso, desde a década de 1990, a PCR é
23 indicada para a detecção de espécies de *Brucella* (Baily et.al, 1992; Morata et al., 1999).

24 Em 1992, Baily e colaboradores conseguiram condições de reação e *primers*
25 adequados para a detecção de *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* e afirmaram que a PCR
26 era capaz de identificar a *Brucella*, mesmo se presente em pequenas quantidades. Esse fato foi
27 reforçado pelos estudos de Leal-Klevezas e colaboradores em 1995, quando verificaram que
28 seus *primers* e ensaios da PCR foram altamente sensíveis e versáteis, pois foram capazes de
29 detectar menos de 10 células/mL de leite, em amostras contendo *Brucella* spp. em uma
30 variedade de protocolos, ou seja, diferentes temperaturas de anelamento, concentrações de
31 *primers* e MgCl₂.

32 Em meados de 1996, Rijpens e colaboradores sugeriram o uso da PCR para a
33 confirmação de culturas de *Brucella* spp. eliminando, assim,

1 demorados testes bioquímicos e sorológicos. Ao mesmo tempo, Da Costa et al. (1996),
2 afirmaram ser a PCR uma técnica robusta, altamente específica, que deveria ser aplicada no
3 diagnóstico da brucelose, após extração de DNA de todas as estirpes de referência e de
4 vacinas de *Brucella* e sua amplificação por PCR, com especificidade dos produtos
5 amplificados confirmada pelo uso do DNA de 98 micro-organismos não *Brucella*.

6 Posteriormente aos trabalhos de Da Costa et al. (1996), numerosos ensaios baseados
7 em PCR têm sido desenvolvidos para a identificação de *Brucella*, objetivando melhorar a
8 capacidade de diagnóstico. Na fase inicial dos estudos, as análises se limitavam à
9 identificação do DNA obtido da cultura dos micro-organismos, mesmo sabendo-se que é mais
10 efetiva a detecção direta do material sob suspeita de contaminação. Foi focada, então, a busca
11 por técnicas mais apuradas para remoção de inibidores da polimerase, sem dúvida a maior
12 dificuldade encontrada na implementação dos protocolos. Estudos como o de Romero e
13 Lopez-Goñi (1999) foram fundamentais para a resolução desse inconveniente. Finalmente, a
14 PCR pôde ser realizada diretamente em material como tecidos, sangue, leite, secreções nasais,
15 sêmen e produtos alimentícios, principalmente leite e queijos moles (Bricker, 2002).

16 O método de PCR foi aprimorado para a detecção de *Brucella* spp. diretamente
17 em queijos, após a superação de problemas com a exclusão de inibidores. A técnica mostrou-
18 se simples, com boa sensibilidade e especificidade; rápida; menos dispendiosa que análises
19 bacteriológicas convencionais; além de não ser afetada pela presença de outros micro-
20 organismos presentes na amostra. Destacando-se, assim, como excelente na análise de
21 queijos, do ponto de vista epidemiológico, por ser um teste bastante útil e rápido para
22 determinação da qualidade sanitária desse alimento e sua matéria-prima (Serpe et al., 1999;
23 Tantillo et al., 2001).

24 Dessa forma, diante da intensa comercialização de queijos elaborados com leite cru,
25 passíveis de veicular agentes causadores de brucelose, objetivou-se detectar *Brucella* spp. pela
26 técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) diretamente de amostras de queijos de
27 coalho comercializados na cidade de Parnaíba-PI, Brasil.

28

29 **Material e métodos**

30 Realizou-se um levantamento dos pontos de comercialização de queijos de coalho na
31 cidade de Parnaíba-PI. Dentre supermercados, mercadinhos, padarias, açougues, mercados
32 públicos e “bancas”, 66 pontos de venda foram identificados e deles, 30 escolhidos de forma

1 aleatória para a coleta de amostras de queijos de coalho produzidos com leite cru no período
2 de novembro de 2011 a janeiro de 2012.

3 As amostras acondicionadas em caixas isotérmicas com baterias de gelo reciclável,
4 foram remetidas em duplicatas ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento
5 de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

6 O preparo para as análises moleculares seguiu o método citado por Miyashiro (2004).
7 Homogeneizou-se 25 g de cada amostra com 100 mL de caldo *Brucella* em Stomacher. Após
8 60 segundos em repouso, alíquotas de 1 mL foram acondicionadas em tubos de polipropileno
9 e armazenados a -20°C até o momento da análise. O descongelamento ocorreu pouco antes
10 das análises e alíquotas de 200 µL foram submetidas à extração de DNA, utilizando o
11 protocolo para bactérias Gram negativas do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit.

12 Os *primers* de eleição foram os que têm por alvo a região 16S-23S do rRNA para
13 *Brucella* spp.: ITS66: ACATAGATCGCAGGCCAGTCA e ITS279:
14 AGATACCGACGCAAACGCTAC. Para a reação de PCR utilizou-se mix Quiagen®, água
15 ultrapura como controle negativo e DNA de cepa de *Brucella ovis* (Reo 198), cedida pelo
16 Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – MG/Brasil, como controle positivo.

17 As temperaturas de desnaturação e anelamento utilizadas foram aquelas determinadas
18 por Alves et al. (2010). Após desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, o perfil de PCR foi
19 obtido da seguinte forma: 30 s de desnaturação molde a 95 °C, 30 s de emparelhamento a 62
20 °C e 30 s de extensão do *primer* a 72 °C, para um total de 40 ciclos, com uma extensão final a
21 72 °C durante 5 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de
22 agarose a 2% (p/v) em cuba horizontal com tampão de corrida TAE 1x, corados com blue
23 green (LGC® 0,5 mg/mL) e padrão de peso molecular de 100 pb. As bandas de DNA foram
24 visualizadas sob luz UV e comparadas com o padrão de peso molecular, sendo consideradas
25 positivas aquelas com peso molecular aproximado de 214 pb.

26

27 **Resultados e discussão**

28 Ao se analisar 30 amostras de queijos de coalho produzidos com leite cru,
29 comercializados na cidade de Parnaíba, sete apresentaram bandas de peso molecular
30 compatível com *Brucella* spp. (23,3%). O elevado percentual de amostras positivas é
31 preocupante se for considerado que o consumo desse queijo é alto, principalmente pela
32 população do Nordeste, que prefere consumir o produto cru, ampliando a possibilidade de
33 veiculação do agente.

1 No presente estudo, os resultados observados são superiores aos obtidos por Miyashiro
2 (2004), que detectou *Brucella* utilizando a mesma técnica de PCR, em 20,46% de queijos
3 minas frescal, cuja tecnologia de fabricação se assemelha as dos queijos de coalho produzidos
4 no Nordeste brasileiro.

5 Tantillo et al. (2001) detectaram *Brucella* spp. em 46% das amostras de queijos
6 produzidos com leite de ovinos e caprinos comercializados em fazendas e mercados do sul da
7 Itália, entre a Calábria e Puglia, através da PCR levando-os a indicar essa técnica para
8 detecção de *Brucella* spp. diretamente em queijos, dada sua boa sensibilidade e especificidade
9 do método e por ser mais rápido e menos dispendioso do que os ensaios bacteriológicos
10 convencionais.

11 Números menores de amostras positivas foram obtidas por Öngör et al. (2006) ao
12 analisarem 40 amostras de queijo recolhidos de vários mercados do leste da Turquia, nas
13 quais a *Brucella* foi detectada por PCR em 5% das amostras e por Kobayashi (2012) que
14 encontrou em 11,63% dos queijos artesanais de origem clandestina comercializados na cidade
15 de São Paulo – Brasil.

16 É importante salientar que o fato da detecção de DNA de *Brucella* nas amostras
17 analisadas pode dever-se exclusivamente à presença de “resíduo” de material genético desse
18 patógeno, incapaz de provocar doença, ou, ainda, de *Brucella* originária de cepa vacinal ou, o
19 que é mais preocupante, da presença do patógeno viável em queijos de coalho produzidos
20 com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba.

21 Segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Piauí (ADAPI) vacinam-se
22 contra a brucelose as fêmeas de 3 a 8 meses de idade utilizando a vacina B-19. Os animais
23 vacinados são marcados a ferro com um “V” e número relativo ao ano no lado esquerdo da
24 cara, de acordo com a legislação e, anualmente, é feito o teste de soroaglutinação no
25 reprodutor e em fêmeas com idade superior a 2 anos, eliminando-se os animais positivos
26 (ADAPI, 2013).

27 Contudo, segundo a Defesa Sanitária Animal do Piauí – ADAPI, de julho de 2010 a
28 abril de 2013 a vacinação contra brucelose só consta em bovinos nos meses de julho, agosto e
29 setembro de 2010 (ADAPI, 2014).

30 Assim sendo, no período de coleta das amostras utilizadas neste experimento, não foi
31 observado o acompanhamento da brucelose bovina nesse Estado diminuindo,
32 consideravelmente, a possibilidade do DNA identificado nas amostras ser oriundo de cepa

1 vacinal excretada na matéria-prima de produção das amostras de queijos de coalho (ADAPI,
2 2014).

5 **Conclusões**

6 Foi comprovada a eficácia do método de PCR na detecção de *Brucella* spp. em queijos
7 de coalho, com elevada proporção de positividade, de forma rápida e precisa.

8 Ressalta-se que para que o uso deste teste torne-se rotineiro no controle da brucelose
9 em toda a cadeia produtiva de queijos de coalho (desde a triagem dos animais que fornecem a
10 matéria-prima até o produto final), faz-se necessário o aprimoramento de técnicas de PCR
11 multiplex para esse produto, a fim de distinguir de forma mais rápida, precisa e numa única
12 análise, espécies de *Brucella*, incluindo aquelas de origem vacinal.

14 **Referências**

15 ALVES, C. J.; FIGUEIREDO, S. M. DE; AZEVEDO, S. S. DE; et al. Detection of *Brucella*
16 *ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast region of Brazil. *Brazilian Journal of*
17 *Microbiology*, 41(2), 365-367. 2010.

18 AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ - ADAPI. Relatório do Programa
19 Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovinas – PECEBT, 2012.
20 Agência de Defesa Agropecuária do Piauí, 2013.

21 AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PIAUÍ – ADAPI. Informe
22 mensal de ocorrências de doenças e atividades profiláticas – Piauí. Disponível em:
23 <<http://www.adapi.pi.gov.br/vigilancia-epidemiologica/boletim-epidemologico>> Acesso em:
24 05/02/14.

25 BAILY, G.C.; KRAHN, J.B.; DRASAR B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella*
26 *melitensis* and *abortus* by DNA amplification. *Journal of tropical medicine and hygiene*, 95,
27 271-275. 1992.

28 BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p.
29 435-446, 2002.

30 CARVALHO, M.S. et al. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. *Medicina Interna*,
31 Lisboa, v.2, n.4, p.259-261, 1995.

32 DA COSTA, M.; GUILLOU, J.P.; GARIN-BASTUJI, B. et al. Specificity of six gene
33 sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal of Applied*
34 *Bacteriology*. Sep;81(3):267-75, 1996.

35 FREITAS FILHO, J.R. et al. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado
36 em Jucati – PE. *Revista Eletrônica de Extensão*, v. 6, n. 8, p.35-49, dez., 2009.

- 1 KOBAYASHI, P. DE F.. Monitoramento dos principais agentes zoonóticos em leite e seus
2 derivados de origem clandestina, provenientes de animais criados às margens do Rio Tietê.
3 São Paulo, 2012. *Dissertação* (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Segurança Alimentar
4 e Sanidade no Agroecossistema. Instituto Biológico (São Paulo).
- 5 LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa*
6 *Veterinária Brasileira.*, v. 3, n. 12, p. 1059-1065, dez., 2011.
- 7 LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I. O.; LÓPEZ-MERINO, A.;
8 MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and
9 milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(12):3087, 1995.
- 10 MIYASHIRO, S. Presença de DNA de *Brucella abortus* em produtos lácteos clandestinos:
11 diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em
12 cadeia (PCR). 2004. 75f. *Dissertação* (mestrado), Universidade de São Paulo, Faculdade de
13 Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.
14 São Paulo.
- 15 MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; REGUERA, J.M.. et al. Posttreatment follow-up
16 of brucellosis by pcr assay. *Journal of Clinical Microbiology.* P. 4163–4166 vol. 37, n.12.
17 Dec. 1999.
- 18 NASSU, R.T.; ARAÚJO, R.S.; BORGES, M.F.; et al.. Diagnóstico das condições de
19 processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza :
20 Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.
- 21 NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de coalho. Coleção agroindústria
22 familiar. EMBRAPA - *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, Embrapa
23 Agroindústria Tropical, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa
24 Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2006.
- 25 ÖNGÖR, H.; ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; BULUT,H.. Evaluation of
26 Immunomagnetic Separation–Polymerase Chain Reaction in Direct Detection of *Brucella*
27 *abortus* and *Brucella melitensis* from Cheese Samples. *Foodborne Pathogens and Disease.*
28 V. 3, n. 3, 2006.
- 29 RIJPPENS, N.P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M. et al. Direct Detection of *Brucella* spp.
30 in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. *Applied*
31 *and Environmental Microbiology.* P. 1683–1688. Vol. 62, No. 5. May 1996.
- 32 ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from
33 bovine Milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Applied and Environmental*
34 *Microbiology.* P. 3735–3737. Vol. 65, No. 8. Aug. 1999.
- 35 SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em
36 Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais - Brasil,
37 v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.
- 38 SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; et al.. Single-step method for rapid detection of
39 *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *Journal of Dairy*
40 *Research* 66 313±317. 1999

- 1 TANTILLO, G.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C.. Polymerase chain
- 2 reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *Journal of Food*
- 3 *Protection*. Feb;64(2):164-7. 2001.

ABDULLAH, M.I.M.; DAWOUD, A.S.; BAZALOU, M.S.. **Occurrence of *Brucella* in some unheated dairy products in Damietta governorate regarding its health importance.** Najran University, 2007. Disponível em : <<http://dspace.nu.edu.sa/xmlui/handle/123456789/20>>. Acesso em: 02/02/2013.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ - ADAPI. **Brucelose e tuberculose.** 2013. Disponível em: <<http://www.adapi.pi.gov.br/brucelose-e-tuberculose/apresentacao>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ - ADAPI. **Relatório do Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovinas – PECEBT, 2012.** Agência de Defesa Agropecuária do Piauí, 2013.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PIAUÍ – ADAPI. **Informe mensal de ocorrências de doenças e atividades profiláticas – Piauí.** Disponível em: <<http://www.adapi.pi.gov.br/vigilancia-epidemiologica/boletim-epidemiologico>> Acesso em: 05/02/14.

AKBARMHR, J. The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. **African Journal of Microbiology Research** 5(12), 1500-1503, 2011.

ALMEIDA, G. M. **Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, no município de Ouro Preto do Oeste – Rondônia, Brasil.** 2010. X f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; PIETZ, D. E. (Ed.). **Laboratory techniques in brucellosis.** 2nd ed. Geneva: World Health Organisation, 1975.

ALVES, C. J. et al. Detection of *Brucella ovis* in ovine from Paraíba State, in the Northeast region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, 365-367, 2010.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Edição comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar. Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004 - Versão Preliminar.

ARAUJO, J.B.C.; PIMENTEL, J.C.M.; NETO, A.G.V.; MATTOS; A.L.A.; PESSOA, P.F.A. de P.. **Adoção de tecnologia para melhoria do processo de produção de queijo de coalho artesanal de agricultores familiares dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande Do Norte.** XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual: Desafios da Engenharia de Produção na Consolidação do Brasil no Cenário Econômico Mundial Belo Horizonte, MG, Brasil, 04 a 07 de outubro de 2011.

BAILY, G.C. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *abortus* by DNA amplification. **Journal of tropical medicine and hygiene**, Londres, Reino Unido, n. 95, p. 271-275, 1992.

BALBANI, A.P.S.; BUTUGAN, O.. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria** (São Paulo) 2001;23(4):320-8

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT).** Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Manual Técnico. Organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. REP., 15 ago. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 2 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 jan. 2001. p. 1-54.

BRASIL (2006) Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba – CODEVASF **Plano de Ação para o Desenvolvimento Integrado da Bacia do Parnaíba, PLANAP** : síntese executiva : Território Vales dos rios Piauí e Itaueiras / Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba – CODEVASF. – Brasília, DF : TDA Desenhos & Arte Ltda. 68p. : il. – (Plano de Ação para o Desenvolvimento Integrado da Bacia do Parnaíba, PLANAP ; v.9).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57 de 16 de setembro de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 dez. 2011 - Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Morbidade do SUS por local de residência**: lista morbidade CID-10: Brucellos. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nruf.def>>. Acesso em: 23 maio 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 ago. 2013 - Seção 1.

BRICKER, B .J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**,. v. 90, p. 435-446, 2002.

BROUGH, H .A. et al. Brucellosis acquired by eating imported cheese. **Journal of Paediatrics and Child Health**, Australia, n. 47, p. 840–841, 2011.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in roman populations. **Journal of Infection**, n. 45, p. 122–127, 2002.

CARNEIRO, T.S.; ALVES, A.A.; AZEVÊDO, D.M.M.R.; BEZERRA, E.E.A., CATALANO, Dario. Caracterização e Eficiência Produtiva de Rebanhos Bovinos Leiteiros Participantes do Programa INFOLEITE no Baixo Parnaíba, Piauí. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v.8, n.2, 2006.

CARVALHO, M.S. et al. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, Lisboa, v.2, n.4, p.259-261, 1995.

CASTRO, K. N .C. et al. Bovinocultura leiteira de agricultores familiares de Parnaíba-PI. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 6, 2012.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**. 2005. 182 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CENSO AGROPECUÁRIO 2006. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=220770&idtema=3&search=piauiparnaiba|censo-agropecuário-2006>> Acesso em: 01/02/2013.

COELHO, L. M.; MARTINS, L.; EVANGELISTA, F. H. Prevalência da brucelose nos trabalhadores de matadouro em São Luís, estado do Maranhão. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, 1995.

COLMENERO, J. D. et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction improves conventional microbiological diagnosis in an outbreak of brucellosis due to ingestion of unpasteurized goat cheese. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 294–296, 2011.

COSTA, S. L. **Avaliação do controle de qualidade do queijo de coalho em laticínios**. (2009) 46p. Monografia. (Especialização Latu Sensu em Gestão da Qualidade Vigilância Sanitária em Alimentos) Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Recife, PE.

CRAVO, M. A; COTRIM, W. S. Análise comparativa da legislação brasileira e europeia para queijos artesanais. **Caderno de Pós-graduação da FAZU** (Faculdades Associadas de Uberaba). V.12 (2011).

CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. “Se o leite é cozido, o queijo não é Serrano”: tradição, conhecimento e discurso instituído no controverso debate em torno de queijos feitos de leite cru. In: COLÓQUIO DE AGRICULTURA FAMILIAR E DESENVOLVIMENTO RURAL, 3. Porto Alegre, 2011.

CUNHA, M.; MIGUEL, N., MANSO, A. **Brucelose em pediatria**. Secção de Infecçologia Pediátrica, maio 2002.

CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, N. J. A review. Brucellosis – new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1270–1281, 2005.

DA COSTA, M. et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 267-275, sep. 1996.

DAHOUK, S. S. et al. Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962-2005. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, USA, v. 13, n. 12, p. 1895-1900, dec. 2007.

D’ANASTASIO, R. et al. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 139, p. 149–156, 2011.

DIAS, I. C. L. Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos. **Vivências**, v. 8, n.15, p. 89-98, out. 2012.

DIXON, P. H. **European systems for the safe production of raw milk cheese**. A report presented to the Vermont Cheese Council. November 28, 2000.

EL-DAHER, N.; A'WAS, T.; AL-QADERI, S. The effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 523-528, 1990.

EKER, A. et al. A patient with brucellar cervical spondylodiscitis complicated by epidural abscess. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, p. 428-430, 2011.

FEKETE, A. et al. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. **Journal Applied Bacteriology**, v. 69, n. 2, p. 216-227, aug. 1990.

FELICIANO, M. Á. R. et al. Prevalencia serológica y factores asociados a la infección de brucelosis en una población de alto riesgo, en el municipio de Tapachula, Chiapas. México. **Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica**, Distrito Federal, México, v. 29, supl. 1, p. 93, mar. 2004.

FRIZZO, L. N. **Os Desafios da produção de leite e as consequências sobre o desenvolvimento regional: o caso da normativa 51**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento) - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS.

FREITAS FILHO, J.R. et al. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em jucati – pe. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 6, n. 8, p.35-49, dez., 2009.

GERMANO, P.M.L E GERMANO, M.I.S.. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo, Manole, 2001.

GOMES, M.J.P. **Gênero *Brucella* spp.** Microbiologia Clínica. 2005.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite, alimento imprescindível, mas com riscos à saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, SP, v. 16, n. 1, p. 38-51, mar. 2009.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; ÜMRAN, O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 53-61, may 2003.

GUZZO, J. R. O Queijo e a lei. **Revista VEJA**, São Paulo, p. 154, out. 2012.

IBGE. **Parnaíba-PI**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=220770#>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

JÚNIOR G. N. et al. Brucelose em touros: uma visão da doença no Brasil com ênfase ao diagnóstico e sua importância ao agronegócio. **Tekhne e Logos**, Botucatu, SP, v. 3, n. 3, 21p, nov. 2012.

KARAGIANNIS, I. et al. Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece, 2008. **Eurosurveillance**, Stockholm, Sweden, v. 17, n. 11, art.20116, 2012.

KASIMOGLU, A. Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kirikkale. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr**, 3 (3): 245-50. 2002.

- KOBAYASHI, P. de F. **Monitoramento dos principais agentes zoonóticos em leite e seus derivados de origem clandestina, provenientes de animais criados às margens do Rio Tietê.** 2012. 61. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico, São Paulo.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido.** ed 6, São Paulo: Guanabara koogan, 1760p. 2008.
- LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, RJ, Brasil, v. 3, n. 12, p. 1059-1065, dez. 2011.
- LAWINSKY, M .L. J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Panamericana de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 75-84, 2010.
- LEAL-KLEVEZAS, D. S. et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 12, p. 3087, 1995.
- MAGALHÃES, V.; LIMA, R. de A. Brucelose: relato de dois casos. **Arquivos Brasileiros de Medicina.** V.7, nº1. Janeiro/fevereiro, 1997.
- MENEZES, S. de S.M.. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)** V. 28, No. 1, 2011.
- MILLER, M. A.; PAIGE, J. C. Other food borne infections. **Microbial Food Borne Pathogens**, v. 14, fasc. 1, p. 71-89, 1998.
- MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em produtos lácteos clandestinos:** diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR). 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MONSALVE, J. C. A.; AVILA, G. G.; VALDEPENAS, M. A. R. Tres brotes de brucelosis investigados em um año de vigilância de salud laboral en Ciudad Real. Nota de campo. **Gaceta Sanitaria**, Barcelona, Espanha, v. 23, n. 6, p. 562–563, 2009.
- MONSALVE, J. C. et al. Estudio de un brote epidémico de 81 casos de brucelosis consecutivo al consumo de queso fresco sin pasteurizar. **Revista Española de Salud Pública**, Madrid, Espanha, v. 70, n. 3, p. 303-311, mayo/jun. 1996.
- MONTALVO, R. et al. Síndrome de guillain barré asociado a brucelosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, Peru, v. 27, n. 2, p. 292-295, 2010.
- MONTEIRO, L.A. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, RJ, Brasil, v. 26, n. 4, p. 217-222. out./dez. 2006.
- MORALES, D. F.; COMBARIZA, D. A. Soroprevalencia de brucelosis em trabajadores de mataderos de municipios del Tolima (Colombia). **Revista Ciência e Salud**, Bogotá, Colombia, v. 2, n. 1, p. 15-23, jan./jun. 2004.
- MORATA, P. et al. Posttreatment follow-up of brucellosis by pcr assay. **Journal of clinical microbiology**, Washington DC, USA, v. 37, n. 12, p. 4163–4166, dec. 1999.

NASCIMENTO, M. G. F. et al. Levantamento de *Brucella abortus* em queijos Minas Frescal comercializados no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, Brasil, v. 16, n. 101, p. 63-66, out. 2002.

NASSU, R.T.; ARAÚJO, R.S.; BORGES, M.F.; LIMA, J.R.; MACÊDO; B.A.; LIMA, M.H.P.; BASTOS, M.S.R.. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. **Queijo de coalho**. Coleção agroindústria familiar. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2006.

OIE. **Brucellosis**. 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-EN.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2013.

ÖNGÖR, H.; ÇETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; BULUT,H.. Evaluation of Immunomagnetic Separation–Polymerase Chain Reaction in Direct Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from Cheese Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**. V. 3, n. 3, 2006.

OSTERMAN, B.; MORIYÓN, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, United Kingdon, v. 56, p. 1173–1175, 2006.

PACHECO, A. M. et al. A Importância da brucelose bovina na saúde pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, Brasil, ano VI, n. 11, 2008.

PACHECO, H. A. “Identificación de factores de riesgo de brucelosis como zoonosis en la república mexicana,” *LIII Reunion Annual de la Sociedad Mexicana de Salud Publica*: Monterrey 41 (1999). Disponível em: <[http://www.docstoc.com/docs/20552914/IDENTIFICACI%*c3*%93N-DE-FACTORES-DE-RIESGO-DE-BRUCÉLOSIS-COMO-ZOONOSIS](http://www.docstoc.com/docs/20552914/IDENTIFICACI%c3%93N-DE-FACTORES-DE-RIESGO-DE-BRUCÉLOSIS-COMO-ZOONOSIS)>. Acesso em: 21 jan. 2013.

PADILHA, M. R. F. et al. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG, Brasil, v. 34, n. 2. p. 167-171, mar./abr. 2001.

PAPAS, G. et al. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, London/NewYork, 6(2): 91-9. Fev., 2006.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A Experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 105-112, abr./jun. 2002.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose: uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, Lisboa, Portugal, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

POLETTI, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 595-598, mar./abr. 2004.

PREFEITURA DE PARNAÍBA. **Parnaíba-PI**. 2013. Disponível em: <http://www.parnaiba.pi.gov.br/nphb/index.php?option=com_content&view=article&id=36&Itemid=39>. Acesso em: 17 abr. 2013.

PURWAR, S.. Human Brucellosis: A Burden of Half-Million Cases per Year. **Southern Medical Journal**, Nov;100(11):1074. 2007.

REGO, J. M. A. N. **Dos sertões aos mares: história do comércio dos comerciantes de Parnaíba (1700-1950)**. 2010. 291p. Tese (Doutorado em História) - Instituto de Ciências Humanas e Filosofia, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

RIJPENS, N. P. et al. Direct Detection of *Brucella* spp. in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, USA, v. 62, n. 5, p. 1683–1688, may 1996.

ROMERO, C. et al. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington-DC, USA, v. 33, n. 12, p. 3198–3200, dec. 1995.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from bovine Milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, USA, v. 65, n. 8, p. 3735–3737, aug. 1999.

ROSSI JR, O.D.; AMARAL, L.A.; FILHO, A.N.. Bactérias do gênero *Aeromonas* em água de matadouro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.52 n.. Belo Horizonte, outubro, 2000.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais - Brasil, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SANTOS, H. P. et al. Brucelose bovina e humana diagnosticada em matadouro municipal de São Luís - MA, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 10, n. 2/3, p. 86-94, maio/dez., 2007.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Micro-organismos patogênicos e qualidade do leite**. Curso online: Monitoramento da qualidade do leite. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), 2012. Disponível em: <http://paraiso.ifto.edu.br/docente/admin/upload/docs_upload/material_d5fbcca1e6.pdf>. Acesso em: 23 de nov. de 2012.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, United Kingdom, n. 60, p. 801–808, 2010.

SEBRAE/PI. **Diagnóstico Socioeconômico das Bacias Leiteiras de Parnaíba-PI e Teresina-PI**. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – Administração Regional do Piauí: Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Piauí. Teresina: SEBRAE/PI, 2005.

SERPE, L. et al. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, United Kingdom, n. 66, p. 313-317, 1999.

SOUZA, A. P.; MOREIRA FILHO, D. C.; FÁVERO, M. Investigação da brucelose em bovinos e em consumidores humanos do leite. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, n.11, p. 238-247, 1977.

SOUZA, D. D. P. **Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para a saúde pública. Estudo dos fatores relacionados a esse consumo no município de Jacareí – SP.** 2005. 116. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPINOLA, A. G.; COSTA, M. D. M. Brucelose humana em operários de um frigorífico no município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, n. 6, p. 157-165, 1972.

TANTILLO, G. et al. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of Food Protection**, USA, v. 64, n. 2, p. 164-167, feb. 2001.

TANTILLO, G. M.; DI PINTO, A.; BUONAVOGLIA, C. Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, United Kingdom, n. 70, p. 245–247, 2003.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, USA, v. 3, n. 4, 425-434, oct./dec. 1997.

TESKE, S. S. et al. Animal and human dose-response models for *Brucella* Species. **Risk Analysis**, v. 31, n. 10, 1576- 1596, 2011.

TRABULSI, L.R. E ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976.

VIANA, L. et al. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v.77, n. 3, p. 517-520, jul./set. 2010.

VOROU, R. et al. Local brucellosis out break on Thassos, Greece: a preliminary report. **Eurosurveillance**, Stockholm Sweden, v. 13, Issues 4–6, apr./jun. 2008.

WEST, H. G. Food fears and raw-milk cheese. **Appetite**, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom, v. 51, n. 1, p. 25–29, 2008.

YU, W. L.; NIELSEN, K.. Molecular Detection and Typing of *Brucella* sp. **Croatian Medical Journal**, Salata - Zagreb, n. 51, p. 306-313, 2010.

ZAFFARI, C. B. **Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. em queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do Rio Grande do Sul.** 2005. 100p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.



ISSN 1517-8382 *printed version*
ISSN 1678-4405 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope of the journal](#)
- [Submission of a manuscript](#)
- [Publication of a manuscript](#)
- [Preparation of a manuscript](#)

Scope of the journal

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications, and reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

- **Research paper:** the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.
- **Short Communication:** a Short Communication is a concise account of new and significant findings.
- **Mini-review:** Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest.

SECTIONS

Industrial Microbiology: Bacterial Fermentation

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria.
- molecular aspects of bacterial biotechnology

Industrial Microbiology: Fungal Fermentation

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi
- molecular aspects of fungal biotechnology

Food Microbiology: Food Technology

- applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production

Food Microbiology: Food Safety and Quality

- food borne diseases
- food spoilage
- microbial ecology in foods

Medical Microbiology: Bacterial Pathogenesis

- genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis

Medical Microbiology: Clinical Bacteriology

- studies of medically-important bacteria

Medical Microbiology: Fungal Pathogenesis

- genetic, biochemical, and structural basis of

pathogenesis of fungi

Medical Microbiology: Clinical Microbiology

- studies of medically-important fungi

Environmental Microbiology: Microbial Ecology

- ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms
- microbial interactions

Environmental Microbiology: Biotechnology

- environmental aspects of public health
- biodegradation
- bioremediation
- environmental considerations for genetically engineered microorganisms

Fungal Physiology

- fungal biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process

Bacterial Physiology

- bacterial biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process

Genetics and Molecular Biology of Fungi

- fungal genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

Genetics and Molecular Biology of Bacteria

- bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

Genetics and Molecular Biology of Viruses

- viral genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

Veterinary Microbiology

- diseases of animals
- control and/or treatment of animals
- animal pathogen diagnostics
- veterinary or zoonotic pathogens

Education in Microbiology

- Teaching strategies in microbiology
- New teaching tools in microbiology

Submission of a manuscript

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously

been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

Publication of a manuscript

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

ETHICS:

When the study, described in the manuscript, is related to experiments carried out with human beings and/or animals, author(s) must inform, within the text, if the research project has been approved by the Research Ethics Committee of their institution, according to the Declaration of Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppq/helsin5.htm>). Experimental studies involving animals should follow the guidelines established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), and the *Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA) (Ethical Principles for Animal Experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>).

Preparation of a manuscript

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)

- References

For **short communications**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words
- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For **mini-reviews**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (*Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*) and the units are to be used according to SI (*International Systems of Units*).

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. When authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that...Do not use capital letters.

SUGGESTED REVIEWERS

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, e.mail address, and the home institution.

USE OF PLANT EXTRACTS IN MICROBIOLOGICAL EXPERIMENTS

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

Authors may need, or wish, to use professional language editing services to improve papers in English and, therefore, overall quality. This assistance is suggested either before an article is submitted for peer review or before it is accepted for publication. Non-native English speakers and international authors who would like assistance with their writing, may likely consider the following options:

- American Journal Experts, English Editing: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk

- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. The citations in the text have to be written by the last name(s) of the author(s), followed by the year of publication. As an example, see below: "...while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" or "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." For two or more papers by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas (example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou *et al.*, 2012). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

- Journal** **article**
Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.
- Paper** **or** **chapter** **in** **a** **book**
Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In*: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.
- Book**
Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

- d. **Patent**
Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.
- e. **Thesis and Dissertations**
Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).
- f. **Communications in events (Symposia, Conferences, etc)**
Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.
- g. **Publication in the web**
Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>
- h. **Webpage**
U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

PHOTOGRAPHS: Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflicts of Interest

It is Brazilian Journal of Microbiology policy that everyone involved in the publication process (authors, reviewers, editorial board members, and editorial staff) must be free from conflicts of interest that could adversely influence their judgment, objectivity or loyalty to the article and assignments. The BJM recognizes that any potential conflict of interest raised must be disclosed promptly to Editor. Conflicts of interest in publishing can be defined as conditions in which an individual holds conflicting or competing interests that could bias editorial decisions. Conflicts of interest may be only potential or perceived, or they may be factual. Personal, political, financial, academic, or religious considerations can affect objectivity in numerous ways.

AUTHORS' COPYRIGHT

Upon receipt of the galley proofs for approval, authors of approved manuscripts should fax or email the Author's Copyright Statement to the BJM (55-11-3037-

7095, bjm@sbmicrobiologia.org.br). The statement (see text below) must be signed by at least one of the authors (who agrees to inform the other authors, if any).

TRANSFER OF AUTHORS' COPYRIGHT

"The undersigned author(s) state(s) that the article being submitted is original, does not infringe copyright laws or any other third-party property rights, has not been previously published, and is not being considered for publication elsewhere. The author(s) confirm(s) that the final version of the manuscript has been reviewed and approved by all authors. All manuscripts published become the permanent property of the Brazilian Journal of Microbiology and can not be published without authorization in writing from its Editors."

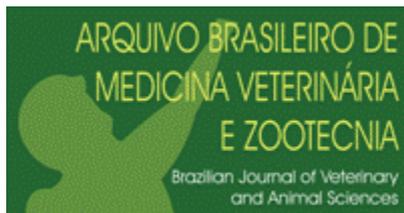
Article No. _____

Title of the article:

"_____ "Name(s) of the author(s)

Signature(s)

Date: ____/_____/_____



ISSN 0102-0935 *versão impressa*
ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientação para tramitação de artigos](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no

endereço www.abmvz.org.br.

- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e

Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura: Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências;

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

strong>Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte

consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit->

[RelatedArticles/](#)>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência ou "Aguardando diligência do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação

1. **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
2. **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.