



JULIANA RIBEIRO LUCCI

**LEITE INFORMAL: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E RISCOS
PARA SAÚDE PÚBLICA**

**LAVRAS-MG
2019**

JULIANA RIBEIRO LUCCI

**LEITE INFORMAL: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E RISCOS PARA SAÚDE
PÚBLICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Rodrigues Mattos
Coorientador

LAVRAS-MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lucci, Juliana Ribeiro.

Leite informal : avaliação da qualidade e riscos para saúde pública / Juliana Ribeiro Lucci. - 2019.

66 p.

Orientador(a): Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha
Maria Barcellos Magalhães da Rocha.

Coorientador(a): Marcos Rodrigues Mattos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Inspeção sanitária. 2. Qualidade do leite. 3. PCR. I. da Rocha, Christiane Maria Barcellos Magalhães. II. Mattos, Marcos Rodrigues. III. Título.

JULIANA RIBEIRO LUCCI

LEITE INFORMAL: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E RISCOS PARA SAÚDE PÚBLICA

INFORMAL MILK: QUALITY ASSESSMENT AND RISKS FOR PUBLIC HEALTH

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de setembro de 2019.

Dr. Geraldo Márcio Costa	UFLA
Dra. Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA
Dr. Junio Cesar Jacinto de Paula	EPAMIG/Instituto de Laticínios Cândido Tostes
Dr. Fábio Raphael Pascoti Bruhn	Universidade Federal de Pelotas - UFPel

Profa. Dra. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

Orientadora

LAVRAS

2019

*Ao amor da minha vida, minha mãe Marta Maria
Ao meu pai Mauro Roberto e minha irmã Ludmila, todo meu amor e gratidão
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as graças recebidas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Dr. Junio Cesar, do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILTC) na cidade de Juiz de Fora, por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento dos experimentos e confiar no projeto.

Ao Centro Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC-JF) na cidade de Juiz de Fora, por ceder o laboratório para a realização das análises microbiológicas.

À minha orientadora Dra. Christiane Rocha (Kity) pelos dez anos de amizade, por ser uma mãe, dando-me apoio nos momentos difíceis durante esses anos.

Ao meu coorientador Dr. Marcos Rodrigues Mattos, pela disponibilidade e paciência para sanar todas minhas dúvidas.

À professora Elaine Maria Seles Dorneles por proporcionar o desenvolvimento do projeto.

Ao professor Dr. Geraldo Márcio da Costa, por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento dos experimentos e sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas e ter boas conversas.

Aos meus amigos de Lavras e Juiz de Fora: Débora Daher, Marina Rosa, Gabriela Pessoa, Lucas Januzzi, Edna Lopes, Juliana Rosa, Andrea, João Luiz, Geisse Kelly, Verônica Ferreira, pela amizade e todo apoio prestado.

Ao Dr. Wesley Máximo, pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e pela paciência durante todo o processo de análises.

À Fátima, secretária do PPGCV, pela disponibilidade, conversas e risadas. A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, por tornar o ambiente de estudo melhor.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia da UFLA, Cristiane, Izabella, Denis Lúcio, e, aos demais colegas da pós-graduação, pelas experiências trocadas ao longo do curso.

À minha mãe Marta que sempre me ensinou que o caminho da vitória pode ser tortuoso, mas sempre é recompensador. Agradeço tudo que tenho a essa mulher maravilhosa que sempre me apoiou e dedicou sua vida à felicidade das suas filhas.

Ao meu pai Mauro Roberto pelo apoio e orações.

À minha irmã Ludmila pelas longas conversas e apoio nos momentos felizes e tristes.

Não há palavras para agradecer a todas as pessoas envolvidas nessa conquista, dedico a todos vocês meu eterno agradecimento!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser
uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência”.
(Albert Einstein)

RESUMO

O leite é um dos alimentos mais completos por apresentar elevado valor nutritivo, sendo fonte de proteínas, vitaminas, gorduras, sais minerais, carboidratos e água. Devido a sua rica composição, o leite torna-se fundamental para a dieta humana, razão pela qual é amplamente comercializado e consumido pela população, sobretudo por crianças e idosos. Porém, traz risco de disseminação de patógenos ligados à saúde dos animais e, também por ser um meio adequado para o desenvolvimento e multiplicação de vários microrganismos, por sua composição química e pH próximo da neutralidade. Diversas fraudes no leite cru são empregadas para mascarar a baixa qualidade do leite, principalmente no produto comercializado no mercado informal. O objetivo do trabalho foi verificar em amostras de leite informal a ocorrência de fraudes e contaminações que ocasionem riscos à saúde do consumidor. Para tanto, foram coletadas 33 amostras de leite comercializados nas cidades de Juiz de Fora (516 mil habitantes), Lavras (92 mil habitantes) e Ijaci (5 mil habitantes), MG. Os leites informais eram comercializados em mercearias e por vendedores que entregam em domicílio utilizando motos, carroças e carros. A coleta das amostras de leite foi realizada por meio de busca ativa nas ruas das cidades e por indicações dos consumidores. Foram realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas a fim de avaliar a qualidade e ocorrência de fraudes em leite cru. Foi observado que onze amostras apresentaram alteração em densidade, dez em sólidos não gordurosos, oito em sólidos totais e doze amostras com acidez fora dos parâmetros permitidos pela legislação vigente. Nas análises microbiológicas verificou-se que todas as amostras apresentaram crescimento de aeróbios mesófilos, 28 amostras com crescimento de coliformes totais e 32 de *Staphylococcus aureus*. Ainda, sete (21,21%) apresentaram crescimento de *Escherichia coli*, sendo que em uma foi isolada e identificada *Brucella abortus* por meio do PCR AMOS. No PCR em tempo real, uma amostra foi considerada suspeita para *Mycobacterium bovis* e nove para *Brucella*. Por meio das análises do leite foi verificada a importância do consumo de produtos inspecionados, tratados termicamente conforme a legislação. Observou-se fraude e alta contaminação por patógenos de importância para a saúde pública. O controle microbiológico do leite e produtos lácteos é extremamente importante para a saúde do consumidor. Faz-se necessário a conscientização da população sobre a importância do consumo de produtos de origem animal inspecionados.

Palavras-chave: qualidade do leite, PCR, inspeção sanitária, vigilância sanitária, *Brucella*.

ABSTRACT

Milk is one of the most complete foods because it has a high nutritional value, being a source of proteins, vitamins, fats, minerals, carbohydrates and water. Due to its rich composition, milk becomes essential for the human diet, which is why it is widely marketed and consumed by the population, especially by children and the elderly. However, it carries a risk of spreading pathogens linked to the health of animals and, also because it is an adequate means for the development and multiplication of various microorganisms, due to its chemical composition and pH close to neutrality. Several frauds in raw milk are used to mask the low quality of milk, mainly in the product sold in the informal market. The objective of the work was to verify in informal milk samples the occurrence of fraud and contamination that cause risks to the consumer's health. To this end, 33 samples of milk sold in the cities of Juiz de Fora (516 thousand inhabitants), Lavras (92 thousand inhabitants) and Ijaci (5 thousand inhabitants), MG, were collected. Informal milks were sold in grocery stores and by sellers who deliver at home using motorbikes, carts and cars. The collection of milk samples was carried out by means of an active search on the streets of cities and by recommendations from consumers. Physical-chemical and microbiological analyzes were carried out to assess the quality and occurrence of fraud in raw milk. It was observed that eleven samples showed alteration in density, ten in non-fat solids, eight in total solids and twelve samples with acidity outside the parameters allowed by the current legislation. In the microbiological analyzes it was verified that all the samples presented growth of mesophilic aerobes, 28 samples with growth of total coliforms and 32 of *Staphylococcus aureus*. In addition, seven (21.21%) showed growth of *Escherichia coli*, one of which was isolated and identified by *Brucella abortus* using PCR AMOS. In real-time PCR, one sample was considered suspect for *Mycobacterium bovis* and nine for *Brucella*. Through the analysis of milk it was verified the importance of consuming inspected products, heat treated according to the legislation. Fraud and high contamination by pathogens of public health importance were observed. The microbiological control of milk and dairy products is extremely important for the consumer's health. It is necessary to make the population aware of the importance of consuming inspected animal products.

Key words: milk quality, PCR, health inspection, health surveillance, *Brucella*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Metodologia aplicada nas análises do Petrifilm™	49
Tabela 2 Variáveis das qPCRs utilizadas neste trabalho	50
Tabela 3 Parâmetros físico-químicos das amostras de leite informal	51
Tabela 4 Parâmetros microbiológicos das amostras de leite informal.	52

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	16
REFERENCIAL TEÓRICO	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE A QUALIDADE DO LEITE	17
3 ZOONOSES RELEVANTES TRANSMITIDAS PELO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS	19
3.1 Salmonelose	20
3.2 Brucelose	23
3.3 Tuberculose	25
3.4 Listeriose	27
3.5 Infecção Estafilocócicas	29
3.6 Campilobacteriose	30
4 ANÁLISES PARA DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE INFORMAL	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	38
SEGUNDA PARTE	46
ARTIGO – QUALIDADE SANITÁRIA DE LEITE INFORMAL COMERCIALIZADO NAS CIDADES DE JUIZ DE FORA, LAVRAS E IJACI - BRASIL.....	46

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em proteína, cálcio e diversos outros nutrientes, sendo um importante alimento na dieta humana. Porém, por ser de origem animal e eficiente meio de cultura para microorganismos oferece muitos riscos para transmissão de patógenos aos consumidores. A transmissão de microorganismos pelo leite pode ser de origem dos animais produtores, ou de contaminação na ordenha ou armazenamento. Esse último, pode ser agravado pela proliferação de micro-organismos na falta de refrigeração. Exemplos de patógenos que podem ter origem em doenças nos animais podem ser as *Brucella* spp. e, de contaminação, as bactérias do grupo coliformes. Quando essa contaminação é de origem fecal animal ou humana, então, os riscos de transmissão de patógenos envolvidos em doenças de transmissão foco-oral são um agravante.

Por tudo isso, há uma legislação que regulamenta a obtenção e venda de leite no Brasil, que exige que o leite e seus derivados passem por fiscalização sanitária antes do consumo. Exige ainda que o leite cru deve ser submetido à pasteurização ou a outros processos industriais, que incluam o aquecimento a altas temperaturas, tendo o produto final o carimbo dos Serviços de Inspeção Federal (SIF), Estadual (SIE) ou Municipal (SIM), além da identificação do produtor e indústria onde foi beneficiado (ABRAHÃO et al. 2005).

Atualmente, as legislações vigentes que regem os parâmetros de qualidade do leite fluido são: a Instrução Normativa (IN) da Presidência da República nº 76 de 26 de novembro de 2018 e, o Decreto nº 9013 de 29 de março de 2017 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece o Regulamento Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).

Os processos térmicos permitidos são a pasteurização lenta (63°C a 65°C por 30 minutos), pasteurização rápida (72°C a 75°C por 15 a 20 segundos) e processamento UHT “*ultra high temperature*” no qual se emprega o aquecimento do leite a 130°C a 150°C por 2 a 4 segundos no leite cru, a fim de reduzir a carga bacteriana e eliminar todas as bactérias patogênicas. A pasteurização lenta é permitida apenas para realização de produtos lácteos como fabricação de queijos e outros derivados (BRASIL, 2017).

Dessa forma, não é permitida a venda de leite cru diretamente do produtor ao consumidor, portanto sem tratamento térmico ou fiscalização sanitária. O comércio de

leite cru informal é proibido no Brasil desde a década de 1950 pela Lei nº 1.283, de 18/12/1950, e pelo Decreto nº 30.691, de 29/03/1952 (MONTANHINI; HEIN, 2013). A informalidade traz consigo o aspecto da ilegalidade, que fomenta o risco do uso de fraudes para mascarar os efeitos das ações de degradação microbiológica até a venda e também baratear o produto. Há, portanto, dentre os comerciantes deste tipo de leite, àqueles que desconhecem os riscos, que expõem aos consumidores ou não têm alternativas para comercialização formal de seu produto, e àqueles que agem de má fé para alcançar maiores lucros, do que teria se entregasse o leite para a indústria e não se importam com a saúde de seus consumidores.

Além disso, Lucci (2014) demonstrou que em torno de 30% da população desses municípios declaram consumir o leite informal. A maioria sabe que é contra a legislação, mas não compreende os riscos para saúde, pois consideram esse leite de maior qualidade por ser “natural”. Isso demonstra a necessidade de melhoria da educação sanitária sobre esse assunto no Brasil.

Isto posto, esse estudo tem como objetivo levantar os riscos a saúde do consumidor imposto pelo consumo do leite informal. Para tanto foram escolhidos três municípios no estado de Minas Gerais de diferentes portes, considerando sua população para testar a qualidade do leite informal da forma como o produto chega a casa dos consumidores. A cidade de Juiz de Fora é a quarta cidade mineira mais populosa, localizada na Zona da Mata, com população estimada em 2019 de 568.873 habitantes; Lavras e Ijaci estão na região do Campo das Vertentes com população estimada de 103.773 e 6.550 em 2019, respectivamente (IBGE, 2019b).

Esta tese está organizada em duas partes: a primeira parte constitui uma introdução geral, contendo uma revisão bibliográfica sobre a legislação vigente referente à comercialização e padrões físico-químicos e microbiológicos de leite e as análises comumente realizadas para avaliação da qualidade do leite. Em seguida, serão apresentados tópicos relacionados às doenças transmitidas por leite e produtos lácteos.

A segunda parte compreende o artigo científico, “Leite informal: avaliação da qualidade e riscos para saúde pública”. No artigo está descrito toda metodologia empregada na análise das amostras de leite, verificando a qualidade e os riscos ao consumir esse tipo de leite informal.

PRIMEIRA PARTE

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O conceito de leite está relacionado a uma ordenha completa, ininterrupta adquirido com boas condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

O leite é um alimento nobre, rico em nutrientes e importante, principalmente, na alimentação das crianças e idosos como forma de obtenção de minerais para crescimento e reparação de tecidos e ossos. Porém, pode trazer riscos de transmissão de patógenos se não forem considerados os cuidados sanitários necessários.

O leite ideal deve conter características como sabor pouco pronunciado, doce e salgado devido à presença de lactose e cloretos, não ácido nem amargo, com coloração branca ligeiramente amarelada, sendo assim uma mistura homogênea de substâncias como lactose, glicérides, proteínas, vitaminas, enzimas, sais minerais, água, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro (SILVA, 1997).

Fontes de contaminação do leite podem estar associadas com procedimentos incorretos de higienização em equipamentos da ordenha, do armazenamento incorreto e a contaminação cruzada de leite provenientes de animais doentes, resultando em um produto com alta contagem microbiana (BRITO et al., 2000; PINTO et al., 2006), tornando-se fontes potenciais de transmissão de zoonoses (MELVILLE et al., 2006).

Além disso, o leite constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos microrganismos devido à sua riqueza nutritiva, sendo veículo de transmissão de importantes zoonoses. Assim, os cuidados com a higiene devem ser realizados desde a ordenha até o produto final, deve-se prevenir e controlar a entrada de patógenos por meio da higienização das plataformas de recepção do leite e dos equipamentos, realizando principalmente a educação sanitária dos manipuladores e funcionários para que este processo ocorra corretamente (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

Com intuito de evitar a ocorrência de zoonoses e estabelecer critérios de qualidade no leite, o governo brasileiro estabelece padrões de qualidade para leite e seus derivados. As leis e normativas vigentes buscam padronizar e estimular os produtores a obterem produtos com baixa contagem bacteriana e livres de patógenos, principalmente agentes zoonóticos, assegurando assim a saúde dos consumidores e a qualidade dos produtos lácteos.

2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE A QUALIDADE DO LEITE

O comércio de leite cru informal é proibido no Brasil desde a década de 1950 pela Lei nº 1.283, de 18/12/1950, e pelo Decreto nº 30.691, de 29/03/1952 (MONTANHINI; HEIN, 2013). Apesar de proibido, ainda é comum o comércio do “leite informal”, pois muitos consumidores consideram um produto de boa qualidade, um produto livre de “química”, um produto fresco e com preço inferior ao industrializado. Fatores socioeconômicos e culturais fazem com que o leite informal permaneça presente no comércio clandestino, mantendo a fama de produto fresco, livre de contaminantes e com valor nutricional maior (SEBRAE, 2013; SILVA et al., 2008).

No âmbito da produção leiteira, a legislação brasileira é fortemente atualizada de tempos em tempos com a finalidade de melhorar os parâmetros de qualidade a fim de assegurar a saúde dos consumidores.

A legislação brasileira exige que, antes do consumo, o leite de vaca e seus derivados passem pela fiscalização sanitária. O processo deve ocorrer nas usinas de beneficiamento, onde o produto líquido e ainda cru deve ser submetido à pasteurização ou a outros processos industriais que incluam o aquecimento a altas temperaturas, tendo o produto final o carimbo dos Serviços de Inspeção Federal (SIF), Estadual (SIE) ou Municipal (SIM), sendo as siglas associadas sempre a um número que identifica o produtor e a indústria (ABRAHÃO et al. 2005).

Atualmente as legislações vigentes, que regem os parâmetros de qualidade do leite fluido são a Instrução Normativa (IN) nº 76 de 26 de novembro de 2018 (DOU, 2019) e Decreto da Presidência da República nº 9013 de 29 de março de 2017 do MAPA, que estabelece o Regulamento Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).

Os processos térmicos permitidos são a pasteurização lenta (63°C a 65°C por 30 minutos), pasteurização rápida (72°C a 75°C por 15 a 20 segundos) e processamento UHT “*ultra high temperature*” no qual se emprega o aquecimento do leite a 130°C a 150°C por 2 a 4 segundos no leite cru, a fim de reduzir a carga bacteriana e eliminar todas as bactérias patogênicas. A pasteurização lenta é permitida apenas para realização de produtos lácteos como fabricação de queijos e outros derivados (BRASIL, 2017).

A IN 76/2018 do MAPA fixa os regulamentos técnicos de identidade e as características de qualidade para o leite cru refrigerado; leite pasteurizado e leite pasteurizado

tipo A. O leite cru ser mantido durante seu transporte na temperatura até 7°C (admitindo-se, excepcionalmente até 9°C) e sendo conservadas nos postos de refrigeração, usinas de beneficiamento e fábricas de laticínios com a temperatura a 4°C.

Variáveis de qualidade são estipuladas na legislação, dentre alguns parâmetros estabelecidos para o leite cru refrigerado estão o teor mínimo de gordura de 3%; proteína com 2,9 gramas/100gramas; lactose com 4,3 gramas/100gramas; sólidos totais em 11,4 gramas/100gramas; sólidos não gordurosos com 8,4 gramas/100gramas; acidez titulável entre 0,14 a 0,18 gramas de ácido láctico/100mL; densidade relativa a 15°C entre 1,028 e 1,034; índice crioscópico entre -0,530°H e -0,555° Hortvet (BRASIL, 2017).

O art.26 da IN76 de 2018-MAPA cita “O leite cru refrigerado não deve apresentar substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico.” No que se refere a padrões microbiológicos, a legislação estabelece uma contagem de células somáticas de no máximo 500 mil células por mililitro e contagem padrão de placas de no máximo de 300 mil unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro; sendo permitida a contagem de 900 mil UFC antes do processamento térmico no estabelecimento beneficiador. (BRASIL, 2018a).

A sanidade do rebanho leiteiro é de extrema importância para obtenção de um produto livre de patógenos zoonóticos. Segundo Decreto 9.013 (RIISPOA) é proibido o uso de leite de fêmeas, que apresentem diagnóstico positivo para doenças infectocontagiosas, que possam ser transmitidas aos seres humanos, como brucelose, listeriose, tuberculose, entre outras (BRASIL, 2017).

Todo o controle da qualidade físico-química e microbiológica no leite comercializado tem o intuito de oferecer um alimento seguro à população. Leite produtos lácteos necessitam passar por tratamento térmico com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos patogênicos e deteriorantes.

Algumas legislações, como a Lei 23.157 para produção e comercialização de queijos artesanais no estado de Minas Gerais, permitem a elaboração de subprodutos oriundos de leite cru, porém esses produtores seguem uma legislação específica e recebem um processo de fiscalização constante nos produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Sendo um ponto importante para conscientização de produtos vendidos ilegalmente dos produtos artesanais que possuem o selo ARTE do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O selo ARTE foi criado pela Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018 com a finalidade de permitir que produtos artesanais como queijos, embutidos, pescados e mel possam ser vendidos livremente em qualquer parte do território nacional mantendo aspectos higiênico-sanitários e de qualidade presentes.

Os alimentos artesanais serão submetidos ao controle do serviço de inspeção oficial, pelos órgãos sanitários dos estados e do Distrito Federal e devem ter fabricação individualizada e genuína, que mantenha a singularidade e as características tradicionais, culturais ou regionais, sendo devidamente identificada com o selo ARTE. Com isso os produtos de origem animal artesanais serão registrados nos órgãos dos Estados (SIE) ou Municípios (SIM) e serão comercializados em todo território nacional.

Produtos ilegais/informais não recebem nenhum tipo de selo, pois não seguem nenhuma legislação vigente. A ausência dos selos demonstra que não receberam nenhum tipo de fiscalização e, portanto, não têm garantias de qualidade sanitária. Isso eleva o risco do consumo de produtos contaminados e impróprios ao consumo.

3 ZOONOSES RELEVANTES TRANSMITIDAS PELO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS

Zoonoses são “doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e seres humanos” (OMS, 2016).

Os alimentos têm papel fundamental na saúde humana, sendo fundamentais em proporções adequadas, para uma vida saudável e equilibrada. Porém, podem ser fontes de contaminação sendo responsáveis pela manutenção dos ciclos das conhecidas doenças transmitidas por alimentos (DTA).

O comércio internacional e o trânsito de produtos de origem animal (POA) trazem o risco de introduzir novos patógenos ou reintroduzir àqueles já considerados erradicados em um país livre. A globalização e o crescente fluxo de bens e pessoas permitem a transição de agentes patogênicos em viagens pelo mundo todo, circulando em diversos países e em curtos espaços de tempo. (JANSEN et al., 2019).

Existem mais de 250 tipos de DTA e a maioria dessas são infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas, príons, agrotóxicos, substâncias químicas e metais pesados. A sobrevivência e a multiplicação de um agente etiológico nos alimentos dependem de seus mecanismos de defesa e das condições do meio, expressas principalmente pelos níveis

de oxigenação, nutrientes, pH, quantidade de água livre e temperatura de acordo com cada alimento (BRASIL, 2010).

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais se destacam: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados à população (BRASIL, 2010). Os microrganismos associados as DTA podem ser transmitidos a partir das fezes contaminadas, do ambiente, dos utensílios, de práticas de higiene insatisfatórias, bem como da obtenção, estocagem, processamento e transporte incorreto dos alimentos (PINTO et al., 2013).

Entre o ano de 2009 até meados de 2018, ocorreram 6.809 surtos de DTA registrados no Brasil, tendo a região Sudeste o maior número de notificações no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Esse período, 2.350 surtos tiveram seus alimentos discriminados, sendo o leite e seus derivados o quarto alimento com maior notificação (7,8%); ovos o quinto (5,6%) e a carne bovina na sexta colocação (5,3%) dos registros (BRASIL, 2018c).

Os principais agentes etiológicos envolvidos nos 2.431 surtos registrados entre 2009 até meados de 2018 foram: *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; Coliformes; Norovírus; Rotavírus; *Shigella*; *Bacillus cereus*; *Clostridium perfringens* e o vírus da hepatite A.

Diversas doenças atribuídas ao consumo de produtos lácteos contaminados são de conhecimento desde o início da indústria laticinista. A contaminação do leite com microrganismos patogênicos pode ocorrer em diversas etapas da produção, da obtenção do leite de animais doentes, do beneficiamento, do armazenamento, da distribuição e no consumo, ocorrendo uma associação dessas etapas com as práticas inadequadas de manejo, de higienização e conservação da matéria prima e equipamentos (PINTO et al., 2013).

Àquelas que estão relacionadas a transmissão das nesse estudo serão abordadas em seguida.

3.1 Salmonelose

A *Salmonella* continua sendo um dos agentes etiológicos mais frequentes de infecções alimentares em todo o mundo. Casos de salmonelose em seres humanos podem ocorrer por meio de contato com animais em residências, clínicas veterinárias, zoológicos, jardins, ambientes agrícolas ou outros locais públicos e privados, mas a maioria dos casos está associada à origem alimentar, muitas vezes derivada indiretamente de contaminação fecal animal ou humana (PINTO et al., 2013; SILVA; CALVA; MALOY, 2014).

Diversos surtos de salmonelose são notificados todos os anos, sendo associados, principalmente, com a ingestão de leite e produtos lácteos elaborados com leite cru, leite pasteurizado processado incorretamente ou à contaminação pós-pasteurização devido à má condição higiênica, ocorrendo contaminação cruzada. Os bovinos podem, ocasionalmente, durante a fase febril de salmonelose excretar o microrganismo no seu leite ou, mais frequentemente, nas fezes contaminadas. Durante a ordenha, os animais assintomáticos ou com casos clínicos instalados podem contaminar o leite. O leite também pode sofrer uma contaminação indireta, pelo uso de água poluída ou equipamentos sujos durante a ordenha (PINTO et al., 2013; WRAY; WRAY, 2000).

Desde 1985, houve um aumento significativo na incidência de salmonelose em muitos países. Durante a década de 1990, a bactéria foi disseminada, provavelmente, para os sistemas de produção de aves de países em desenvolvimento (SCHLUNDT et al., 2004).

Por outro lado, em vários países, a incidência de salmonelose vem diminuindo devido à implementação de medidas de controle, incluindo uma maior sensibilização da população para o risco. Diante desse risco evidente, no Brasil, a legislação exige ausência do patógeno em amostras mínimas de 25 gramas do alimento analisado e disponível para o consumo (PINTO et al., 2013; REZER, 2011). Em amostras de leite e de produtos lácteos importados ilegalmente foram detectados sorovares pouco patogênicos de *Salmonella* em 0,86% das amostras apreendidas, níveis de contaminação comparáveis aos produtos da União Européia (EFSA; ECDC, 2017).

A *Salmonella* pertencente ao gênero da família Enterobacteriaceae. São bactérias gram-negativas anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, possuem formato de bastonetes curtos medindo de 1 a 2 µm, fermentam a glicose e produzem ácido e gás, podem ou não ser móveis (KORNACKI; JOHNSON, 2001; REZER, 2011).

O gênero possui cerca de 2.600 sorotipos, alguns desses sorotipos receberam o nome de acordo com o local onde foram isolados inicialmente, como *S. Dublin* e *S. Heidelberg*. Outros sorotipos foram nomeados após a enfermidade e o animal acometido, como exemplo

S. Typhimurium, que causa a febre tifoide em camundongos (REZER, 2011; SILVA; CALVA; MALOY, 2014).

A *Salmonella* possui duas espécies: a *Salmonella enterica*, isolada mais comumente do homem e de animais de sangue quente e *Salmonella bongori*, isolada usualmente de animais de sangue frio.

A *Salmonella entérica*, de maior relevância para saúde pública é composta de seis subespécies (*S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae*, *S. enterica subsp. indica*) (BRASIL, 2019a; TORRES; HAAS; SIQUEIRA, 2016).

A dose mínima infecciosa para o homem varia de dezenas a milhões de células, porém está relacionada com fatores inerentes aos indivíduos, ao sorotipo e ao tipo do alimento contaminado. Fatalidades são mais frequentemente em populações suscetíveis, como bebês, crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas. Uma pequena proporção de pessoas infectadas pode desenvolver uma doença artrítica, caracterizada por dor nas articulações, irritação ocular e dor ao urinar (PINTO et al., 2013; REZER, 2011; SCHLUNDT et al., 2004).

A forma mais comum da transmissão da doença é por meio da ingestão de alimentos contaminados e dos maus hábitos de higiene. A bactéria atua no epitélio do intestino delgado dos seres humanos, onde se multiplica e invade o íleo e o cólon ficando alojados nos nichos intracelulares (exemplo macrófagos) ocasionando uma resposta inflamatória do organismo (BRASIL, 2019a; SILVA; CALVA; MALOY, 2014).

O período de incubação varia de 6 a 72 horas (usualmente entre 12 e 36 horas) após o consumo do alimento contaminado. Os sinais clínicos costumam permanecer de 2 a 7 dias, até a completa recuperação do paciente. Os sinais clínicos mais comuns são: diarreia, febre, dor abdominal, náusea, vômitos, calafrios, fraqueza e dores de cabeça (BRASIL, 2019a; REZER, 2011; SCHLUNDT et al., 2004).

A infecção muito grave pode levar à deficiência de vitamina B12 e, em consequência, à anemia. O aparecimento de isolados de *Salmonella* resistentes a antibióticos é de extrema preocupação para saúde pública, levando os órgãos competentes a ficarem atentos a fim de evitar ocorrência de novos casos.

A ocorrência das salmoneloses na população humana, transmitida por alimentos, é provavelmente subestimada, principalmente pela falta de notificações e confirmações dos agentes etiológicos (TORRES; HAAS; SIQUEIRA, 2016).

3.2 Brucelose

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa crônica, que acomete os animais e os seres humanos. Possui distribuição mundial causando perdas no sistema produtivo dos animais e agravos à saúde da população (CARVALHO et al., 2016; CASTRO et al., 2005).

Por se tratar de uma zoonose grave, alguns países do norte da União Europeia, Austrália, Canadá e Nova Zelândia conseguiram a erradicação da doença em seu território, porém, na América Latina, Oriente Médio, Norte e Leste da África e Ásia Central e do Sul a brucelose ainda representa uma das doenças economicamente importantes. No Brasil, a *Brucella* spp é frequentemente encontrada e isolada em produtos de origem animal como produtos lácteos elaborados a partir do leite cru (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019; JANSEN et al., 2019).

Melo et al. (2014) em um estudo realizado nos aeroportos internacionais de São Paulo e do Rio de Janeiro, a *Brucella* spp. foi detectada por métodos moleculares em 42% (70/166) de produtos lácteos importados ilegalmente. A alta taxa de detecção de *Brucella* spp. em leite contaminado fornece informações importantes para avaliação de risco, que a população está exposta para a ocorrência de brucelose (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019).

Animais doentes eliminam a bactéria no leite e no ambiente por meio dos resíduos oriundos dos partos e abortos. O leite cru comercializado informalmente, assim como o consumo de produtos lácteos feitos com leite cru, representam o principal fator de risco para a saúde dos seres humanos (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019).

As bactérias do gênero *Brucella* pertencem à família Proteobacteria, e são gram-negativas, intracelulares facultativas, imóveis, não esporuladas, apresentando temperatura de crescimento entre 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo de 6,6 a 7,4. Possuem forma de bastonetes curtos que medem de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (OIE, 2009; PAJUABA, 2006; PROBERT et al., 2004; REDKAR et al., 2001; VELASCO et al., 2000).

As principais espécies do gênero são a *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. suis* (suínos e javalis), *B. melitensis* (isoladas em cabras, ovelhas e camelos), *B. ovis* (ovelhas), *B. neotomae* (ratos do deserto) e *B. canis* (cães). A *B. abortus* possui sete sorovares (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), cinco para *B. suis* (1, 2, 3, 4 e 5) e três para *B. melitensis* (1, 2 e 3), sendo esta a espécie mais virulenta para humanos (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019; FOSTER et al., 2007; MORENO; CLOECKAERT; MORIYÓN, 2002; SCHOLZ et al., 2008).

Fatores como temperatura, pH, concentração de cloreto de sódio, atividade de água e a presença de outros microrganismos, influenciam na sobrevivência de *Brucella* spp. no leite e em produtos lácteos, podendo permanecer no alimento por um período longo entre 15 a 90 dias (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019). A refrigeração inibe a multiplicação, mas não elimina a bactéria. Mesmo em baixas temperaturas, como a do congelamento, a viabilidade bacteriana é mantida. Apesar de haver relatos de isolamento em leite UHT (FALENSKI et al., 2011) a fervura, a pasteurização, a esterilização, a salga e a fermentação são métodos eficazes na eliminação do microrganismo (BRASIL, 2006; CARVALHO et al., 1995; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Após a ingestão de produtos contaminados, as bactérias penetram na mucosa e são fagocitadas, principalmente, por macrófagos, sendo carreadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses, levando à hiperplasia e linfadenite (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; CARVALHO NETA et al., 2010; LAGE et al., 2008). Na fase de multiplicação celular, as bactérias podem provocar alterações inflamatórias e anatopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, ocasionando a hiperplasia linfoide, esplenomegalia e hepatomegalia. A *Brucella* possui predileção pelos tecidos mamários, pelo aparelho locomotor, por órgãos do sistema reprodutor masculino e feminino. O útero gravídico apresenta elevadas concentrações de eritritol e progesterona na placenta fazendo com que a *Brucella* tenha maior afinidade pelos trofoblastos (BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; CAMPOS et al., 2009; CARTER; CHENGAPPA, 1991; LAGE et al., 2008; MATRONE et al., 2009; RIBEIRO; MOTTA; ALMEIDA, 2008; XAVIER, 2009).

O período de incubação pode variar de uma semana a vários meses. Pode ter atuação branda e cura espontânea, ou ser grave e até levar à morte. As principais manifestações clínicas nos animais são retenção de placenta, metrite, endometrite, nascimento de bezerros fracos, orquite, bursite, dores musculares e nas articulações, higromas. Em humanos, os sinais mais evidentes são as febres recorrentes, fraquezas, dores musculares, cefaleia, distúrbios nervosos e sudorese, o que acaba por levar à incapacidade parcial ou total ao trabalho (LAGE et al., 2008; PAULIN; FERREIRA NETO, 2008; RIBEIRO; MOTTA; ALMEIDA, 2008; XAVIER, 2009).

A *Brucella* pode ser detectada frequentemente no leite, apresentando um sério risco para os consumidores de produtos lácteos não pasteurizados. Embora a pasteurização possa, completamente, eliminar os diversos tipos de *Brucella*, o consumo elevado de produtos lácteos contaminados que não recebem nenhum tipo de tratamento térmico ainda é

responsável pela maior parte dos casos de brucelose em diferentes surtos (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019).

Programas adequados de controle da doença no rebanho, a conscientização da população sobre o risco de contaminação ao consumir produtos oriundos de leite cru, controle eficaz da saúde dos trabalhadores, que lidam com os animais, e a implementação dos tratamentos térmicos em todos os produtos lácteos comercializados, representam uma eficiente estratégia para reduzir a ocorrência de brucelose humana.

3.3 Tuberculose

No contexto da saúde pública, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* têm o maior impacto, causando a tuberculose, uma doença zoonótica de distribuição global afetando os seres humanos, animais domésticos e selvagens (BOLAÑOS et al., 2017).

M. tuberculosis e *M. bovis* são bacilos álcool-ácidos resistentes, aeróbios, finos e ligeiramente curvos e medem de 0,5 a 3 µm. Possuem parede celular rica em lipídios o que lhes conferem baixa permeabilidade, reduzindo a efetividade da maioria dos antibióticos e facilitando sua sobrevivência nos macrófagos (ROSSMAN; MACGREGOR, 1995).

Por se tratar de uma doença infectocontagiosa, é transmitida de vertebrados, especialmente de bovinos, para seres humanos diretamente por rotas aerógenas ou, indiretamente, pelo consumo de leite cru e seus derivados (BOUKARY et al. 2012).

A infecção em bovinos causa perdas econômicas aos proprietários de animais positivos na prova tuberculínica, envolvendo, principalmente, a condenação de carcaças em abatedouros frigoríficos, a redução da produção de leite no rebanho leiteiro e a redução ou perda de peso nos animais de corte, sem levar em consideração os embargos internacionais à exportação de produtos de origem bovina (PAES, 2010).

O *Mycobacterium* sp. permanece viável no queijo e no iogurte feitos a partir de leite contaminado, por até 14 dias e, por até 100 dias em manteiga, sendo um agente de extrema importância para vigilância sanitária do país (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Em países da América do Sul, estima-se que 2% dos casos pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares de tuberculose em humanos são causados por *M. bovis* (DE KANTOR et al. 2014). No Brasil, a proporção de tuberculose zoonótica foi 3,5% dos 200 casos analisados em 1974 (CORRÊA; CORRÊA, 1974), embora estudos mais recentes tenham demonstrado que estes dados vêm decrescendo (SILVA et al., 2013; ROCHA et al., 2011).

Em 2017, o número de casos notificados de tuberculose em seres humanos foi de 72.770 e os coeficientes de incidência variaram de 10,0 a 74,7 casos por 100 mil habitantes entre as Unidades Federadas Brasileiras (BRASIL, 2019b).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a tuberculose uma doença reemergente e uma grande ameaça devido ao aumento do número de relatos em humanos, particularmente em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV/AIDS), e a resistência desses patógenos a diversos antibióticos empregados no tratamento clínico (BOLAÑOS et al., 2017).

Sabe-se que diversos fatores de risco estão associados à ocorrência de tuberculose, como a existência de indivíduos portadores do HIV e o consumo de produtos lácteos oriundos de leite cru. O Brasil é uma área enzoótica para tuberculose bovina, estando presente em todo o país desde 1920, mas sempre foi negligenciada e poucas ações com impacto significativo tinham sido tomadas para combater a doença até 2001, quando o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) foi implementado (PAES, 2010; SILVA et al., 2018).

A tuberculose ocorre em bovinos independentemente da idade e gênero, embora devido à evolução crônica, os animais adultos são mais frequentemente diagnosticados e são mais comumente sintomáticos (RADOSTITS et al., 2007). A introdução de animais infectados em um rebanho é provavelmente o principal fator de risco para a propagação da doença entre animais leiteiros (CORRÊA; CORRÊA, 1992). As micobactérias são eliminadas por secreções do trato respiratório, leite, colostro, fezes, urina e, ocasionalmente, sêmen.

Os sinais clínicos da doença em seres humanos manifestam-se sob diferentes apresentações clínicas dependendo do órgão acometido. Logo, quadros envolvendo tosse, hemoptise, dispneia, dor torácica, rouquidão, febre, sudorese, perda ponderal, são parte importante e clássica da imensa gama de manifestações possíveis. É fundamental lembrar, entretanto, que pode existir ampla sintomatologia inespecífica da doença, dependendo do órgão acometido pelo bacilo (KOZAKEVICH; SILVA, 2015).

A progressão da doença crônica é caracterizada por formação de grandes nódulos caseosos, particularmente nos pulmões (infecção pelo ar) e trato intestinal (infecção oral). Em animais imunocomprometidos ou debilitados, a generalização pode ocorrer com a disseminação de pequenos nódulos em vários órgãos, incluindo a glândula mamária (BOLAÑOS et al., 2017).

Medidas devem ser desenvolvidas para identificar e controlar a infecção por *M. bovis*

em animais silvestres e bovinos. Como estes animais são importantes reservatórios naturais deste patógeno faz-se necessário uma atenção maior pela defesa sanitária animal na verificação da doença no rebanho brasileiro.

A tuberculose bovina ocasiona prejuízos à saúde do rebanho bovino e à saúde dos seres humanos que consomem leite cru e/ou produtos derivados do leite cru contaminados, tornando-se assim, uma doença de grande importância para saúde pública brasileira.

3.4 Listeriose

Esta bactéria possui características pertencentes ao gênero *Listeria*, são bastonetes gram positivos, intracelular facultativo, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, pouca motilidade e na forma de bastonetes (NALÉRIO et al., 2009; PETERSEN; MADSEN, 2000).

O gênero *Listeria* possui 17 espécies, porém apenas duas são consideradas patogênicas. A *L. monocytogenes* é considerada patogênica para seres humanos e para várias espécies de animais, enquanto que *L. ivanovii* é patogênica especialmente para ruminantes, mas, ocasionalmente, pode acometer os seres humanos (DHAMA et al., 2015; MCLAUHLIN; MARTIN, 2008).

L. monocytogenes possui 13 sorotipos e quatro linhagens denominadas I, II, III e IV. A linhagem I e os sorotipo 1/2a, 1/2b e 4b são comumente relatados em seres humanos e sorotipos 1/2^a e 4b em animais (ORSI; DEN BAKKER; WIEDMANN, 2011).

L. monocytogenes forma rapidamente biofilmes; é resistente a altas concentrações de sal e ácidos, podendo crescer em pH entre 4,5 e 9,6 e em temperaturas que variam de 4° a 45°C, o que acaba favorecendo a sobrevivência bacteriana por períodos prolongados em alimentos refrigerados e em produtos prontos e aquecidos (DHAMA et al., 2015; SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991; SWAMINATHAN; GERNER, 2007).

A maioria das infecções humanas ocorre por consumo de alimentos contaminados. Surto registrados estavam associados à ingestão de leite contaminado (leite cru ou inadequadamente pasteurizado), de queijos, de sorvetes, de água, de vegetais crus, de patês de carnes, de molhos de carne crua fermentada, de aves cruas ou cozidas, de peixes (inclusive defumados) e, de frutos do mar. Foi observada a sobrevivência da bactéria por 13 anos em leite, por 16 anos em cérebro, por 12 anos em fezes e, por 12 anos em silagem, quando mantida em temperatura abaixo de 5°C (DHAMA et al., 2015).

Alimentos prontos para o consumo desempenham um papel crucial na transmissão de listeriose para a população. Um estudo realizado com 384 amostras de alimentos na Etiópia mostrou uma prevalência de 25% de *L. monocytogenes* entre os quais alguns isolados eram resistentes a múltiplos fármacos (penicilina, ácido nalidíxico, tetraciclina e cloranfenicol), enfatizando a necessidade da adoção de práticas higiênicas em indústrias de processamento de alimentos (GAREDEW et al., 2015).

Sinais clínicos causados por *L. monocytogenes* têm um período de incubação relativamente curto, que vai de poucas horas a 1 ou 3 dias. No entanto, a forma grave da doença pode ter um período de incubação extremamente longo, variando de 3 dias a 3 meses. A listeriose é uma zoonose rara, mas gera graves casos em indivíduos idosos, gestantes e criança. Conhecida como doença da silagem, doença circulante e meningoencefalite, é causada por *Listeria monocytogenes* (REZER, 2011; DHAMA et al., 2015; JANSEN et al., 2019).

A *L. monocytogenes* pode invadir o epitélio gastrointestinal penetrando nos monócitos, macrófagos ou leucócitos polimorfonucleares do hospedeiro, podendo se disseminar pela corrente sanguínea, levando à septicemia. Sua presença em células fagocitárias permite acesso ao cérebro e, provavelmente, migração da placenta para o feto em mulheres grávidas. A patogenicidade da *L. monocytogenes* se concentra na habilidade em sobreviver e multiplicar-se em células fagocitárias de seus hospedeiros (REZER, 2011). A letalidade por listeriose varia de 20% a 30%, de acordo com vários relatórios em humanos (JAHANGIRI et al., 2011; MATEUS et al., 2013).

L. monocytogenes é responsável por várias síndromes nos seres humanos; entre as principais estão abortos, febre, náuseas, vômitos, meningoencefalite, gastroenterite febril (com vômitos e diarreia). Infecções focais, incluindo endocardite, artrite séptica, osteomielite e peritonite, são raras e geralmente precedidas por septicemia (DHAMA et al., 2015; NIEMAN; LORBER, 1980).

A listeriose em mulheres grávidas ocorre mais frequentemente no terceiro trimestre. A infecção na mãe pode ser assintomática, porém, pode ter consequências graves para a criança, incluindo aborto espontâneo, morte fetal, natimorto, septicemia neonatal grave e meningite (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). Em adultos não gestantes, *L. monocytogenes* tem um particular tropismo pelo sistema nervoso central, e infecções do parênquima cerebral e meninges (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000).

Nos animais, a listeriose é caracterizada por sintomas como depressão, febre, mudança

de comportamento, indiferença ao ambiente, quadro de encefalite e meningoencefalite. A doença se apresenta normalmente entre o período do inverno e a primavera. O pH alcalino da silagem aumenta as chances de multiplicação da *L. monocytogenes*. O aparecimento dos sintomas ocorre 10 dias ou mais, após os animais se alimentarem de silagem de baixa qualidade.

3.5 Infecção Estafilocócicas

Staphylococcus aureus é habitualmente encontrado em leite e derivados e está associado a doenças transmitidas por alimentos quando encontrado em altas concentrações (10^5 unidades formadoras de colônia [UFC] por grama) devido a ação de suas enterotoxinas que são resistentes ao calor. (JANSEN et al., 2019; PINTO et al., 2013).

Como as toxinas estafilocócicas são termoestáveis, essas não podem ser inativadas por tratamentos térmicos padrões. A inativação da toxina ocorre apenas em autoclave a 15 PSI por 20 minutos. Por isso, evitando a contaminação do alimento pelo microrganismo, a carga de microrganismos deve ser limitada e esse produto deve ser mantido em temperaturas de 0°C a 4°C até o beneficiamento (DHANASHEKAR; AKKINEPALLI; NELLUTLA, 2012; REZER, 2011).

O *S. aureus* é um cocos gram positivo e anaeróbia facultativa. Os reservatórios principais de *S. aureus* são fossas nasais do homem, úberes de vacas e ovelhas com mastite, aves com artrites ou contusões. Secreções do nariz e garganta; mãos; feridas, pústulas e fezes (REZER, 2011).

Apesar dos manipuladores de alimentos serem, normalmente, as principais fontes de contaminação dos alimentos, os equipamentos e as superfícies também tem sua importância na ocorrência de surtos. As intoxicações humanas são causadas pela ingestão enterotoxinas produzidas nos alimentos por algumas linhagens de *Staphylococcus aureus*, porque o alimento não foi mantido quente (60°C ou mais) ou frio o suficiente (7,2°C ou menos) (REZER, 2011).

Em 2016, toxinas bacterianas como de *S. aureus*, foram a segunda principal causa de surtos de origem alimentar na União Européia (EFSA; ECDC, 2017). Em produtos cárneos importados ilegalmente, *S. aureus* foi a bactéria mais detectada (4,3%), muitas vezes em concentrações médias inferiores a 10^5 UFC/g, sendo isolada em maior quantidade em carne suína (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2015). Produtos derivados de leites

contaminados e importados ilegalmente, podem representar um risco para saúde pública, gerando diversos surtos na população (JANSEN et al., 2019).

S. aureus foi o patógeno mais encontrado em leite e produtos lácteos importados ilegalmente (7,4%), muitas vezes em concentrações médias ($> 10^6$ UFC/g). Artursson et al. (2018) analisaram 103 amostras de leite em dois períodos distintos e verificaram a presença de *S. aureus* em 71% das amostras de leite bovino e em 64% de leite caprino, demonstrando a facilidade de detecção desse agente bacteriano em diversos tipos de leite.

Os estafilococos existem no ar, no esgoto, na água, no leite, nos alimentos, ou equipamentos que processam alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios (REZER, 2011).

O período de incubação em seres humanos ocorre entre 30 minutos e seis horas, geralmente de 2 a 4 horas, após a ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada (PINTO et al., 2013).

Os sintomas de intoxicações causadas por estafilococos aparecem rapidamente e incluem náuseas, vômitos e dores abdominais. Em casos mais graves podem ocorrer dor de cabeça, dores musculares, alterações na pressão sanguínea e na taxa de pulsação. Os sintomas podem ser bastante agudos, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento ingerido e da saúde geral da pessoa. A doença é normalmente autolimitante e geralmente tem duração de 2 a 3 dias (REZER, 2011).

3.6 Campilobacteriose

Campylobacter foi reconhecido como causa de infecção em humanos na década de 70 e, atualmente é considerada uma das causas mais comuns de infecção de origem alimentar (PINTO et al., 2013).

Essas bactérias são gram negativas curvas, finos bastonetes, tamanho variável (0,5 a 0,8 μm x 0,2 a 0,5 μm), possuindo a necessidade de ter de 3,5% a 5% de oxigênio e de 2% a 10% de dióxido de carbono para seu crescimento. A partir de flagelos polares realizam um típico movimento de “saca-rolhas” (REZER, 2011; TORRES; HAAS; SIQUEIRA, 2016).

A temperatura ambiente (25°C) não favorece o crescimento microbiano, tendo sua temperatura ideal para crescimento por volta de 42°C a 43°C. Os *Campylobacter* termófilos recebem essa denominação, pois crescem em temperaturas mais altas do que os outros tipos de *Campylobacter*. O microrganismo é muito sensível à secagem e é destruído por cocção de

55°C a 60°C, após alguns minutos (REZER, 2011).

Por não ter seu crescimento favorecido em temperaturas inferiores a 42°C, *Campylobacter* spp. não possui sua multiplicação favorecida durante o abate, após o processamento, durante o transporte e armazenamento. Em bovinos, suínos e aves as concentrações de *Campylobacter* tendem a declinar durante o processo de abate (MATOPE et al., 1998).

Existem duas espécies principais de *Campylobacter* causadoras de doenças alimentares. O *C. jejuni* é frequentemente isolado em galinhas e causa a maioria dos surtos (89% a 93%) em humanos, sendo seguido pelo *C. coli* frequentemente encontrado em porcos e ocasiona de 7% a 10% dos surtos de infecções alimentares (REZER, 2011; SCHLUNDT et al., 2004).

Também o *C. upsaliensis* e o *C. lari*, ocasionalmente, são implicados em surtos alimentares. Tais microrganismos são encontrados em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores e nos pássaros. As rotas da infecção passam pela água contaminada, leite e carne (REZER, 2011).

Existem diversos fatores de risco para a ocorrência da doença na população. Entre os principais estão à ingestão de produtos avícolas, o consumo de carnes mal cozidas, o manuseio de carnes cruas, as atividades relacionadas à ocupação profissional dos funcionários em abatedouros e casas de carnes, a realização de atividades recreativas em ambiente natural e o consumo de produtos lácteos contaminados (NEIMANN, 2001).

A patogênese da *Campylobacter* é pouco conhecida. Diversos determinantes da virulência foram descritos, mas seus papéis relativos e a importância no desenvolvimento da diarreia não são claros. *Campylobacter* enteropatogênico pode causar uma enterocolite aguda, o que pode ser confundida com outras doenças causada por diversos microrganismos patogênicos (SCHLUNDT et al., 2004).

O período de incubação pode variar de um a onze dias, mas, de forma geral, sua duração é rápida, tendo média de um a três dias. A doença é autolimitante, porém, em indivíduos susceptíveis (crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos), ela pode elevar os sinais ao quadro grave, como surgimento de artrite reativa, Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome de Miller Fisher (SCHLUNDT et al., 2004).

Os sinais clínicos normalmente encontrados nos indivíduos humanos são febre, dores abdominais, enterites, diarreia profusa, aquosa e/ou sanguinolenta (TORRES; HAAS; SIQUEIRA, 2016).

Em geral, a maioria das infecções por *Campylobacter* humano é autolimitada e não necessita de terapia antimicrobiana. Entretanto, em casos graves, a medicação pode ser necessária (SCHLUNDT et al., 2004).

4 ANÁLISES PARA DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE INFORMAL

O Brasil é um dos países que possui grande capacidade de produção de leite e derivados devida sua grande extensão territorial e o número de animais destinados à produção leiteira. Apesar de haver diversos fatores favoráveis, em 2018 as exportações brasileiras caíram aproximadamente em volume e em faturamento comparado com o ano anterior (DERAL, 2018).

Os principais estados brasileiros produtores de leite são Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná. Diante da grande produção leiteira nesses estados, as oportunidades para fraude e adulteração de alimentos são ótimas, aumentando assim o volume e valor do produto comercializado. Moyer, DeVries e Spink (2017) relataram os ganhos econômicos e o impacto dos alimentos fraudados com base em estudos de caso e exemplos. De acordo com este estudo, houve diversas oportunidades de fraude e adulteração de alimentos, e essas fraudes são crimes lucrativos.

De acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos (USP, 2015), regiões geográficas com alta vulnerabilidade a fraude e adulteração de alimentos estão frequentemente em áreas com instabilidade política e social. O Brasil encontra muitos dessas condições e é, portanto, propenso à fraude e adulteração de alimentos.

Adulterações de alimentos ocorrem com frequência principalmente em país em desenvolvimento. No Brasil por ser uma área de grande vulnerabilidade, a adulteração de alimentos ocorre de forma ilegal, mas gera muito lucro para produtores.

As fraudes alimentares e as adulterações são ameaças diretas à sustentabilidade, a segurança alimentar, à saúde dos consumidores, as comercializações nacionais e internacionais gerando impactos significativos à economia do país (TIBOLA et al., 2018).

Nos últimos anos, vários casos adulterações em alimentos ocorreram em muitos países. Zhang e Xue (2016) realizaram uma análise sobre alterações intencionais em alimentos na China com base em 1.553 relatórios de escândalos sobre segurança alimentar. No Brasil, todos os anos ocorrem relatos de operações que descubrem irregularidades nos produtos alimentícios.

No ano de 2018 diversas empresas tiveram suas fábricas fechadas ou multadas por

realizarem o processamento incorreto ou adicionarem intencionalmente produtos impróprios aos produtos lácteos a fim de mascarar a qualidade da matéria prima e gerar maiores lucros. Esses casos de fraudes fazem com a confiança dos países importadores, agências reguladoras e dos consumidores fiquem abaladas, levando estes a escolherem imediatamente outros produtos, categorias ou marca para consumo (TIBOLA et al., 2018).

Algumas substâncias adicionadas aos produtos são permitidas em quantidades máximas, já outros componentes quando detectados são considerados impróprios. No que se refere a leite e derivados, para elaboração dos subprodutos existem Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ). Nos regulamentos, os produtos são classificados através dos seus componentes, sendo alguns componentes classificados como obrigatórios e outros opcionais com suas respectivas quantidades permitidas.

A adição de substâncias estranhas na composição normal do leite tem com finalidade principal corrigir erros na qualidade da matéria prima ou corrigir erros no processamento técnico. Podendo ser detectada substâncias intencionalmente para corrigir a acidez e reduzir o crescimento bacteriano (TRONCO, 2013).

Conforme o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA 2017) e a Instrução Normativa (IN) nº 76 de 26 de novembro de 2018, é proibido à presença de substâncias estranhas na composição do leite cru e do pasteurizado, como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico.

A fim de exercer uma ação bacteriostática ou bactericida sobre o desenvolvimento de microrganismos, utiliza-se substâncias químicas como peróxido de hidrogênio, formol, hipoclorito de sódio, ácido bórico e outros componentes com a finalidade de conservar o leite que apresente altos níveis de contagem bacteriana ou que não podem ser armazenados ou beneficiados em poucas horas (TRONCO, 2013).

Segundo o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal lançado em 2018 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realiza-se o teste de ácido cromotrópico para detecção de formaldeídos no leite, utilizando a solução saturada de ácido 1,8-diidroxinaftaleno-3,6-dissulfônico. Existem outras metodologias empregadas na detecção dessa substância no leite como o uso do reativo de Nessler (composto de iodeto de potássio, cloreto de mercúrio e hidróxido de potássio) e a técnica que utiliza ácido sulfúrico a 50% e perclorato de ferro a 2% a fim de verificar a ocorrência da cor roxa ou violeta (TRONCO, 2013).

No método oficial para detecção de peróxido de hidrogênio utiliza-se a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% e a solução hidroalcoólica de guaiacol ($C_7H_8O_2$) a 1% a fim de observar a formação corada em casos positivos, pois a enzima peroxidase presente no leite naturalmente degrada o peróxido de hidrogênio, oxidando o indicador e alterando a coloração. Nos laboratórios dos laticínios é utilizado o reagente Arnold-Mentzel (ácido vanádico em ácido sulfúrico) (BRASIL, 2018b).

O hipoclorito pode ser adicionado ao leite intencionalmente para disfarçar a qualidade microbiológica do leite ou pode aparecer devido resíduos de sanitizantes utilizados na limpeza dos equipamentos e maquinários durante a ordenha e/ou elaboração dos produtos nas indústrias. Para determinar a presença desse composto, utiliza-se o reagente iodeto de potássio.

Devido à presença de bactérias lácticas no leite, essas realizam normalmente a fermentação do carboidrato do leite (lactose) gerando a produção de ácido láctico e demais composto como a liberação de gás. Níveis elevados de bactérias no leite cru geram altos níveis de ácido láctico, esses ácidos são responsáveis pelo aumento da acidez no leite, reduzindo assim a qualidade do leite obtido (TRONCO, 2013).

A acidez do leite é o primeiro ponto a ser avaliado dentro dos laticínios, pela mensuração qualitativa (Alizarol) e da acidez titulável (Acidez Dornic) podemos determinar a estabilidade da proteína do leite, determinado assim seu destino dentro da produção de leite fluído ou de subprodutos.

Oficialmente a técnica para determinação da acidez em leite fluído necessita de solução alcoólica de fenolftaleína e a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a fim de verificar se o leite apresenta acidez titulável entre 0,14 e 0,18 gramas de ácido láctico/100mL ou expressa em graus Dornic no intervalo de 14°D a 18°D (BRASIL, 2018a, 2018b).

Na tentativa de neutralizar e mascarar uma elevada acidez do leite, as substâncias neutralizantes mais empregadas são o bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, cal virgem ou a soda. Na análise para determinar a presença de Bicarbonato de sódio, o uso de álcool absoluto verificará a estabilidade da proteína e ácido rosálico será o marcador de coloração para amostras positivas.

Uma das fraudes comuns é a adição de água no leite com a finalidade de aumentar o volume do produto e, conseqüentemente, elevar o faturamento. Na tentativa de reestabelecer a densidade as substâncias fraudadas, faz-se a adição de substâncias reconstituintes de densidade, sendo o amido, a sacarose e o cloreto de sódio os compostos mais utilizados.

A forma oficial empregada para determinação da densidade relativa a 15°C ocorre pelo uso de densímetro digital, obtendo valores diferentes de 1,028 até 1,034 para leite cru e integral preconizados pela IN 76/2018 faz-se a verificação de possíveis fraudes no leite fluído (BRASIL, 2018a).

Na análise de amido utiliza-se o iodo, este exerce ação sobre a β -amilose, a fração do amido presente na amostra do leite absorve o iodo modificando a coloração para azul acinzentado (BRASIL, 2018b; TRONCO, 2013).

Cloretos são adicionados com intuito de reconstituir a densidade do produto fraudado. A pesquisa oficial dessas substâncias é feita pela reação do nitrato de prata com os cloretos em presença de cromato de potássio como indicador. A coloração amarela indica uma reação positiva devido o consumo maior de nitrato de prata.

Na determinação da presença de sacarose no leite utiliza-se ácido sulfúrico a 50% e resorcina a 1%. A glicose ou frutose acrescentada no leite liberará o radical redutor aldeído que na presença da resorcina (fenol) levará a uma reação de oxirredução de cor rósea (TRONCO, 2013).

Conforme a instrução do MAPA, não é permitido o envio de leite de animais que estejam sendo submetidos a tratamento com drogas e medicamentos de uso veterinário para beneficiamento em estabelecimento industrial. Devido o leite possuir resíduos de antibióticos, os animais em tratamento com esses fármacos devem ser afastados da produção até o cumprimento total do período de metabolização total dos medicamentos, a fim de assegurar níveis nulos ou baixos de resíduos (BRASIL, 2018a).

Os métodos usados para detecção de resíduos de antimicrobianos incluem: método de inibição microbiológica, métodos imunológicos, métodos enzimáticos, cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão (KANG; KONDO, 2001). Segundo Moore, Spink e Lipp (2012) as técnicas mais usadas para detectar fraudes e adulterações em alimentos são cromatografia, espectroscopia e técnicas de identificação molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Nos laticínios utilizam-se kits comerciais disponíveis em diversas marcas com intuito de detectar resíduos de antimicrobianos em, sendo uma técnica de fácil execução, onde o técnico consegue avaliar diversas amostras ao mesmo tempo obtendo um resultado rapidamente (ABRANTES; CAMPÊLO; SILVA, 2014).

Na China em 2008 ocorreu um dos mais graves exemplos de fraude, com a adição de melamina ao leite no intuito de mascarar o seu valor proteico. Em consequência a essa fraude,

300 mil pessoas adoeceram e seis vieram a óbito (SHARMA; PARADAKAR, 2010).

Diversos autores relataram em seus trabalhos a fraude da adição de água em amostras de leite coletadas, sendo assim a principal adulteração encontrada (MONTANHINI; HEIN, 2013; RIBEIRO JÚNIOR, 2013; SILVA et al., 2017).

Rosa-Campos et al. (2011) verificou adições de água, peróxido de hidrogênio e sacarose em amostras de leite integral coletadas para análises na cidade de Brasília-DF.

No ano de 2013, o Ministério Público Brasileiro (MP) e o MAPA criaram uma operação chamada “Leite Compensado” a fim de verificar irregularidade em diversas empresas da cadeia produtiva do leite. Através dessa operação foram verificadas diversas fraudes, como adições de produtos ilegais como água e ureia, a fim de aumentar a quantidade de leite, bem como soda cáustica, peróxido de hidrogênio e cal virgem para reutilização leite deteriorado e/ou prolongar a vida útil do leite nas prateleiras dos supermercados (BREITENBACH; RODRIGUES; BRANDÃO, 2018).

Breitenbach, Rodrigues e Brandão (2018) realizaram entrevistas através de um formulário online com 1.015 entrevistados, desses 73,2% demonstraram conscientização sobre os riscos à saúde relacionados ao consumo de leite com conservantes e contaminantes. Para metade dos entrevistados (55,57%) os escândalos apresentados pelas mídias sobre as adulterações não influenciaram no consumo dos produtos.

Breitenbach e Souza (2015) e Breitenbach, Rodrigues e Brandão (2018) em seus estudos ressaltaram que os entrevistados correlacionam o aumento das fraudes com o aumento da concorrência entre as indústrias de laticínios, essa competição reduz os lucros e a estratégia encontrada pelas empresas para aumentar os ganhos financeiros seria a adulteração dos produtos.

Sucessivos escândalos sobre as fraudes na cadeia de produção de leite geram descreditação dos consumidores diante das marcas comercializadas, abrindo oportunidade para o mercado informal do leite cru e dos produtos considerados “orgânicos”, o que eleva a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (BRANDÃO et al., 2015).

Perante do aumento das descobertas de fraude no leite é importante que as indústrias de leite e derivados cumpram a sua obrigação de controlar rigorosamente a qualidade da matéria-prima recebida e que realizem diariamente as análises necessárias que as legislações solicitam para produção de um produto com boa qualidade e livre de contaminantes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perante todas essas informações, percebe-se a importância de um controle eficiente na qualidade do leite e produtos lácteos comercializados em todo o território nacional. Diversas doenças podem ser carreadas por alimentos de origem animal, principalmente através do leite, produto este de fácil acesso, de baixo custo e rico em nutrientes na alimentação humana.

Exames microbiológicos e físico-químicos são necessários para determinar a qualidade do produto, evitando a ocorrência de fraudes e a transmissão de zoonoses pelo consumo desses produtos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A.; MALUCELLI, M.I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science** v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. da S.; SILVA, J. B. da. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 244-251, 2014.

ARTURSSON, K. et al. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 284, p. 120-127, Nov. 2018.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**, Austin, v. 2, p.1053-1066, 1994.

BOLAÑOS, C. A. D. et al. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, 2017.

BOUKARY, A. R. et. al. Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in Niger. **Transbound Emerg Dis.** 2012.

BRANDÃO, J. B. et al. Leite clandestino: a informalidade orientada pela demanda – um diagnóstico da produção e comercialização em Itaqui/Rio Grande do Sul. **Revista Extensão Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 113-131, abr./jun. 2015.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. 1. Ed.** Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 29 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, n. 230, Seção 1, p. 9, 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa

Agropecuária. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Brasília: MAPA, 2018b. 140 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília, DF, 2018c. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Salmonella (Salmonelose): o que é, causas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Brasília, DF, 2019a. Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/Salmonella>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2. Ed.** Brasília, DF, 2019b. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/25/manual-recomendacoes-tb-20mar19-isbn.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

BREITENBACH, R.; RODRIGUES, H.; BRANDÃO, J. B. Whose fault is it? Fraud scandal in the milk industry and its impact on product image and consumption – The case of Brazil. **Food Research International**, Essex, v. 108, p. 475-481, June 2018.

BREITENBACH, R.; SOUZA, R. S. de. Estrutura, conduta e governança na cadeia produtiva do leite: um estudo multicaso no Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica de Administração**, Porto Alegre, v. 21, n. 3, p. 750-781, 2015.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUE, R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

CAMPOS, D. I. et al. Alterações microscópicas em linfonodos de bovinos sorologicamente positivos para brucelose. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2009.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991, p. 196-201.

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

CARVALHO NETA, A. V., et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 184, n. 2, p. 146-155, May 2010.

CARVALHO, R. F. B.; SANTOS, H. P.; MATHIAS, L. A., PEREIRA, H. M.; PAIXÃO, A. P.; COSTA FILHO, V. M.; ALVES, L. M. C. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-06, 2016.

CORRÊA, C. N.; CORRÊA, W. M. Human tuberculosis by bovine *bacillus* in São Paulo, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 131-134, Jul./Sep. 1974.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

CASTRO, H.A.; GONZÁLEZ, S.R.; PRAT, M.I. Brucelosis: una revisión práctica. *Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Buenos Aires, v.39, n.2, p.203-16, 2005.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.21, n.3, p.281-287, 2001.

DADAR, M.; SHAHALI, Y.; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 292, p. 39-47, Mar. 2019.

DE KANTOR, I. N. et al. *Mycobacterium bovis* infection in humans and animals with an emphasis on countries in Central and South America. In: Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB, editors. **Zoonotic tuberculosis: Mycobacterium bovis** and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing; 2014. p. 35-50.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures, and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 86, n. 2, p. 77-109, Mar. 2006.

DHAMA, K. et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: A comprehensive review. **The Veterinary quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211-235, July 2015.

DHANASHEKAR, R.; AKKINPELLI, S.; NELLUTLA, A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. **Germs**, v. 2, n. 3, p. 101-109, Sept. 2012.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v.15 n.12, p. 228, 2017.

FALENSKI, A. et al. Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 326-330, Jan. 2011.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2688-2693, Nov. 2007.

GAREDEW, L. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of listeria species from ready-to-eat foods of animal origin in Gondar Town, Ethiopia. **BMC Microbiology**, London, v.15, n. 1, p. 1-6, May 2015.

JAHANGIRI, A. et al. An in silico DNA vaccine against *Listeria monocytogenes*. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, n. 40, p. 6948-6958, Sept. 2011.

JANSEN, W. et al. Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. **Veterinary Journal**, London, v. 244, p. 75-82, Feb. 2019.

KANG, J. H.; KONDO, F. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1211-1215, Aug. 2001.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association, Cap. 8, p. 69-82, 2001.

KOZAKEVICH, G. V.; SILVA, R. M. Tuberculose: Revisão de literatura. **ACM: arquivos catarinenses de medicina**, Florianópolis, v. 44, n. 4, p. 34-47, 2015.

LAGE, A. P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 202-212, jul./set. 2008.

MATEUS, T. et al. Listeriosis during pregnancy: a public health concern. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, n. 851712, Sept. 2013.

MATOPE, G. et al. Salmonella enteritidis infection in poultry: an emerging zoonosis in Zimbabwe. **Zimbabwe Veterinary Journal**, v. 29, n.4, p. 132-138, 1998.

MATRONE, M. et al. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 480-489, Sept. 2009.

MCLAUCHLIN, J.; MARTIN, W. Biology. In: LIU D. **Handbook of Listeria monocytogenes**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2008, p. 4.

MELO, C. B. de. et al. Profile of international air passengers intercepted with illegal animal products in baggage at Guarulhos and Galeão airports in Brazil. **SpringerPlus**, v. 3, p. 69, Feb. 2014.

MELVILLE, P.A.; RUZ-PEREZ, M.; YOKOIA, E.; BENITES, N.R. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v.73, n.3, p.295-301, jul./set., 2006.

MONTANHINI, M. T. M.; HEIN, K. K. Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Piraí do Sul, Estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 10-156, 2013.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 4, p. 118-126, Apr. 2012.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 209-227, Dec. 2002.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 4, p. 118-126, Apr. 2012.

MOYER, D. C.; DEVRIES, J. W., & SPINK, J. (2017). The economics of a food fraud incident – Case studies and examples including melamine in wheat gluten. **Food Control**, Vurrey, v. 71, p. 358-364, Jan. 2017.

NALÉRIO, É. S. et al. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.3, p.626- 630, 2009.

NEIMANN, J. The epidemiology of sporadic campylobacteriosis in Denmark investigated by a case control study and strain characterization of patient isolates. Ph.D. Thesis. **Danish Veterinary Laboratory**, VesterKopi, Valby, 2001, 174 pp.

NIEMAN, R. E.; LORBER, B. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.2, n.2, p.207-227, 1980.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code**, 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11.3.htm>. Acesso em 22 de jun. 2019

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Zoonoses**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/zoonoses/en/>>. Acesso em 22 de jun 2016.

ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 301, n. 2, p. 79-96, Feb. 2011.

PAES, A. C. Tuberculose bovina. In: PIRES, A. V. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, p. 993-1015.

PAJUABA, A. C. A. M. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de anticorpos produzidos por bovinos vacinados e não-vacinados**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Bovinocultura de Leite – Aspectos do Brasil e Paraná**, 2018.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 389-401, jul./set., 2008.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O Combate à Brucelose Bovina: situação**

brasileira. Jaboticabal: Funep, 2003.

PETERSEN, L.; MADSEN, M. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates and species distribution investigated by conventional culture and the Eia Fossmethod. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.58, n.1-2, p.113-116, June 2000.

PINTO, C. L. de O. et al. **Qualidade Microbiológica do Leite Cru.** 22. ed. Viçosa, MG: EPAMIG, 2013.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.26, n.3, p.645-651, 2006.

PROBERT, W. S. et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 1290-1293, Mar. 2004.

RADOSTITS, O. et al. **Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** 10th ed. Philadelphia: Saunders, 2007.

REDKAR, R. et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, London, v. 15, n. 1, p. 43-52, Feb. 2001.

REZER, J. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 19, p. 50-59, 2011.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físicoquímica do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. de. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n. 2, p.83-92, abr./jun. 2008.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 91, n. 1, p. 14-21, Jan. 2011.

ROCOURT, J.; JACQUET, C. H.; J.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and sea foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.62, n.3, p.197-209, Dec. 2000.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 209, p. 29-33, Sept. 2015.

ROSA-CAMPOS, A. A. et al. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo c produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 379, p. 30-34, mar./abr. 2011.

ROSSMAN, M. D.; MACGREGOR, R. **Introduction and brief history.** 1. ed. Philadelphia:

McGrawHill, 1995.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 375-382, Feb. 2008.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.4, n.2, p.169-183, Apr. 1991.

SCHLUNDT, J. et al. Emerging food-borne zoonoses. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 23, n. 2, p. 513-533, Aug. 2004.

SEBRAE. **Cenários para o leite e derivados na região nordeste em 2020**. Recife, 2013. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/estudo-Cenarios-para-leite-e%20derivados-NE.pdf>>. Acessado em 02 de julho 2019.

SHARMA, K.; PARADAKAR, M. The melamine adulteration scandal. **Food Security**, v. 2, n. 1, p. 97-107, Mar. 2010.

SILVA, P. H. F. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola**, n. 4, p. 1997.

SILVA, C.; CALVA, E.; MALOY, S. One Health and Food-Borne Disease: *Salmonella* Transmission between Humans, Animals, and Plants. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 1, p. 1-9, Feb. 2014.

SILVA, G. W. N. et al. Avaliação físico-química de leite in natura comercializado informalmente no sertão paraibano. **Revista Principia**, João Pessoa, v. 1, n. 35, p. 34-41, junho 2017.

SILVA, M. C. D. da. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2008.

SILVA, M. R. et al. Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 8, p. 1-6, 2018.

SILVA, M. R. et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 321-327, May 2013.

SILVA, P. H. F. da. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola**, n. 6, Nov. 1997.

SWAMINATHAN, B; GERNER-S. P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, p.1236-1243, Sept. 2007.

TIBOLA, C. S. et al. Economically Motivated Food Fraud and Adulteration in Brazil: Incidents and Alternatives to Minimize Occurrence. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 83, n. 8, p. 2028-2038, 2018.

TORRES, A. C. D.; HAAS, D. J.; SIQUEIRA, A. D. Principais zoonoses bacterianas de aves domésticas e silvestres. **Veterinária em Foco**, Porto Alegre, v. 14, n. 1, p. 48-59, jul./dez. 2016.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 5. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2013.

USP. United States Pharmacopeia. Appendix XVII: Food Fraud Mitigation Guidance. **Food Chemicals Codex**, p. 2053-2088, 2015. Disponível em: <<http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.738.3371&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

VELASCO, J. et al. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative *Ochrobactrum* spp, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3210-3218, June 2000.

XAVIER, M. N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos** [online]. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta__o_mnx_final.pdf.

WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, New York: Cabi Publishing, 2000. 459p.

ZHANG, W.; XUE, J. Economically motivated food fraud and adulteration in China: An analysis based on 1553 media reports. **Food Control**, Vurrey, v. 67, p. 192-198, Sept. 2016.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO – QUALIDADE SANITÁRIA DE LEITE INFORMAL COMERCIALIZADO NAS CIDADES DE JUIZ DE FORA, LAVRAS E IJACI - BRASIL.

Juliana Ribeiro Lucci¹, Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha²

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Lavras; ²Orientadora, Doutora e Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Lavra.

Agradecimentos:

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo curso de doutorado,

À CAPES pela bolsa de doutorado de Lucci JR;

Ao CNPq pela bolsa de produtividade de pesquisa de Rocha, CMBM

À UNIPAC-JF, ILCT, LANAGRO-MG, FAPEMIG

INTRODUÇÃO

Em 2019 foi registrado aumento de aquisição na leite cru pelas indústrias brasileiras de 3,4% relativo a 2018 . Sendo Minas Gerais o estado líder no ranking nacional na aquisição de leite (IBGE, 2019a).

O leite é um dos alimentos mais completos por apresentar elevado valor nutritivo, sendo fonte de proteínas, vitaminas, gorduras, sais minerais, carboidratos e água. Devido sua rica composição, o leite torna-se fundamental para a dieta humana, razão pela qual é amplamente comercializado e consumido pela população, sobretudo por crianças e idosos (MARQUES; COELHO JUNIOR; SOARES, 2005; SALVADOR et al., 2012).

Devido a sua rica composição química e pH próximo da neutralidade, o leite é um meio adequado para o desenvolvimento e multiplicação de vários microrganismos (TONINI, 2014). Isso favorece a realização de diversas fraudes no leite cru empregadas para mascarar a baixa qualidade do leite. No mercado informal, isso é frequente, mesmo trazendo o risco de causar diversos problemas alimentares e de saúde pública, além de prejuízos econômicos (SCHUSTER et al., 2006).

O comércio de leite cru informal é proibido no Brasil desde a década de 1950 pela Lei nº 1.283, de 18/12/1950, e pelo Decreto nº 30.691, de 29/03/1952 (MONTANHINI; HEIN, 2013). Apesar disso, muitos consumidores consideram um produto de boa qualidade, e com de baixo custo. Dessa forma, o leite informal permanece presente no comércio clandestino, mantendo a fama de produto livre de contaminantes e fresco (SEBRAE, 2013; SILVA et al., 2008).

A Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018 determina diversos parâmetros físico-químicos e microbiológicos no leite cru refrigerado e pasteurizado. Portanto, produtos que não atendem esses parâmetros seguem na informalidade.

De acordo com o RIISPOA (2017) considera-se fraudado, adulterado ou falsificado o leite que: na elaboração tenham sido empregados matérias-primas ou ingredientes impróprios ou que não atendam ao disposto no regulamento técnico; emprego de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia diferentes daqueles expressos na formulação original com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, deficiências de qualidade da matéria-prima, defeitos na elaboração ou de aumentar o volume ou o peso do produto (BRASIL, 2017a).

Apesar de a legislação brasileira não autorizar a comercialização do leite cru sem tratamento térmico, é grande o comércio deste produto e de seus derivados sem nenhum tipo de inspeção municipal, estadual ou federal, colocando em risco a saúde dos consumidores. A qualidade físico-química e microbiológica do leite comercializado informalmente não está relacionada apenas com sanidade do rebanho leiteiro, mas também das boas práticas de ordenha, do armazenamento, da higiene dos instrumentos, da consciência do produtor em relação a fraudes – como adição de água ou outros ingredientes para aumentar o volume ou mascarar algum parâmetro de qualidade do leite (KITCHEN, 1981; BRASIL, 2017a).

O controle microbiológico em amostras de leite é realizado, principalmente, por pesquisa de microrganismos indicadores, os quais podem fornecer informações sobre as condições sanitárias durante produção, processamento e armazenamento, sobre a estimativa da vida de prateleira do produto, assim como sobre a possível presença de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Constatado o comércio de leite informal nas cidades brasileiras, este estudo teve por objetivos verificar a ocorrência de componentes impróprios para o consumo e a presença de microrganismos acima do permitido pela legislação através de análises físico-químicas e microbiológicas de amostras de leite informal, além de comparar amostras coletadas em cidades de MG com diferentes portes, quanto ao tamanho da população: Juiz de Fora, Lavras e Ijaci.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

As cidades foram escolhidas pelo tamanho das populações e devido à conveniência para realização das análises e disponibilidade dos laboratórios.

A cidade de Juiz de Fora é a quarta cidade mineira mais populosa, está localizada na Zona da Mata mineira, apresentando população estimada em 2019 de 568.873 habitantes. Lavras e Ijaci são municípios mineiros da região do Campo das Vertentes com população estimada de 103.773 e 6.550 em 2019, respectivamente (IBGE, 2019b).

A amostragem nesse projeto foi realizada de forma não aleatória e não probabilística pela impossibilidade de determinar o número de comércios e vendedores desse produto nas cidades, devido ao seu caráter ilegal..

Inicialmente, foi realizado um levantamento por meio de pesquisa em campo a fim de identificar alguns comércios e produtores que realizavam a venda de leite informal diretamente à população nesses municípios. Em todos os locais ou vendedores levantados foram coletadas amostras de leite, trinta e três no período de maio a julho de 2018. Em Ijaci foram coletadas quatro amostras, Lavras nove e vinte amostras em Juiz de Fora - MG.

Todas as amostras de leite informal foram coletadas de forma anônima, pela pesquisadora, por meio de compra do produto, como qualquer consumidor. O leite vendido a granel foi coletado em frascos esterilizados e as amostras de leites vendidos em sacos plásticos ou garrafas pet foram mantidas nos recipientes originais. Todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmicas contendo gelo e transportadas imediatamente para os laboratórios.

As amostras coletadas na cidade de Juiz de Fora foram analisadas no laboratório do Instituto Cândido Tostes (ILCT) e no Centro Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC – JF); as amostras da cidade de Lavras e Ijaci foram analisadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e no Laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Análises Físico-químicas

As determinações físico-químicas realizadas foram: densidade, acidez titulável (acidez Dornic), alizarol, gordura, sólidos totais, sólidos totais desengordurados (BRASIL, 2017a). Em seguida, realizaram-se as pesquisas de adulterantes como cloretos, amido, sacarose, peróxido de hidrogênio, formol, bicarbonato de sódio, hipoclorito e hidróxido de sódio, conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (ZENEBO; PASCUET, 2004).

Análises Microbiológicas

As embalagens com o leite informal foram homogeneizadas e desinfetadas com álcool 70% antes da realização das análises microbiológicas. Utilizaram-se as metodologias prescritas no manual fornecido pela empresa 3M[®], realizando-se as diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) com o diluente estéril de solução salina 0,9% (método ISO 6887-1).

Tabela 1 Metodologia aplicada nas análises do PetrifilmTM

	Placa EC	Placa AC	Placa STX	Placa EL	Placa
Microrganismo	Coliformes totais e <i>E. coli</i>	Aeróbios mesófilos	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Salmonella</i>
Diluição	10^{-2} e 10^{-4}	10^{-2} e 10^{-4}	10^{-1} e 10^{-3}	10^{-1}	
Temperatura	35-37°C	32°C	35-37°C	35- 37°C	42,5°C
Tempo	1ª leitura com 24h 2ª leitura com 48h	48h	24h	28h	24h

Biologia Molecular

As análises de biologia molecular em todas as amostras de leite para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella* spp. Foram realizadas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) do LANAGRO, localizado em Pedro Leopoldo/MGA partir das amostras de leite realizou-se a inoculação em placas com ágar triptose com 5% de SFB mais o suplemento de Farrel a uma temperatura de $37^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ em estufa com 5% de CO₂. As leituras foram realizadas com 01, 03, 06, 08, 12 e 14 dias após a incubação. As colônias típicas foram recolhidas e repicadas novamente para fazer massa bacteriana para realização de uma análise através de um PCR AMOS (A= *abortus*, M= *melitensis*, O= *ovis* e S= *suis*).

Realizou-se também a extração de DNA das amostras de leite para realização do qPCR ou PCR de tempo real, onde a amplificação e detecção ocorrem ao mesmo tempo, dispensando a eletroforese.

Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 700 µL de leite utilizando o kit *DNeasy mericon Food Kit* (Qiagen, Alemanha). O DNA extraído foi avaliado quanto à concentração e presença de inibidores utilizando reação para detecção do DNA ribossomal conforme Tabela 1. Valores acima de 34 são considerados negativos, amostras com valores entre 30 e 34 são consideradas inadequadas para as análises. O termociclador foi programado conforme a seguir: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

PCR para detecção do DNA de *Brucella spp.*

Para a detecção de *Brucella* foram utilizados *primers* que amplificam o elemento de inserção *is711*, presente em todas as bactérias do gênero *Brucella*. Duas qPCR foram utilizadas para a detecção do DNA de *Brucella spp.* conforme descrito na Tabela 1 ambas tendo como alvo a *is711*. A qPCR.is711.128 foi utilizada como triagem das amostras. Aquelas com resultado positivo ou suspeito foram repetidas em triplicata na mesma qPCR e na qPCR.is711.133. Foram considerados resultados positivos os Cqs abaixo de 37, suspeitos Cqs entre 37 e 40 e negativos os Cqs acima de 40 ou amostras que não apresentaram Cqs. A interpretação de resultados leva em consideração a incerteza da medição de 0,92 e 0,31 para as qPCR.is711.128 e qPCR.is711.133, respectivamente. O termociclador foi programado conforme a seguir: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

PCR para detecção de *Mycobacterium* do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Para a detecção de *M. bovis* foram utilizados *primers* para o *is1081*, presente no genoma de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Duas qPCR foram utilizadas para a detecção do DNA de *Mycobacterium* conforme descrito na Tabela 1 ambas tendo como alvo a *is1081* e a *is6110*. A qPCR.is1081.131 foi utilizada como triagem das amostras. Aquelas com resultado positivo ou suspeito foram repetidas em triplicata na mesma qPCR e na qPCR.is6110.148. Foram considerados resultados positivos os Cqs abaixo de 37, suspeitos Cqs entre 37 e 40 e negativos os Cqs acima de 40 ou amostras que não apresentaram Cqs. O termociclador foi programado conforme a seguir: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Tabela 2 Variáveis das qPCRs utilizadas neste trabalho

qPCR	Oligonucleotídeos 5'-3'	Parâmetros da Reação
------	-------------------------	----------------------

qPCR.Eukarya.18s.128	GAGACTCTGGCATGCTAACTAG GGACATCTAAGGGCATCACAG FAM- TGCTCAATCTCGGGTGGCTGAA- BHQ	400 nM for primers, 400 nM for probe, 12.5 µl of Fast Advanced Master Mix (Thermofisher, USA) and 0.6 mM MgCl ₂
qPCR.is711.128	GAC CTT CGG CAA ATG GAC AG TGG TGC TGT CAA TGA GGA CA FAM-CGG CGT ATC AGC CAG GGC AT-IowaBlack	400 nM for primers, 200 nM for probe, 12.5 µl of GoTaq qPCR Mastermix (Promega) and 0.75 mM MgCl ₂
qPCR.is711.133	GAC CTT CGG CAA ATG GAC AG CGG CGT ATC AGC CAG GGC AT FAM- TGC CCC ACA CCC TTC AAC CC-IowaBlack	500 nM for primers, 300 nM for probe, 12.5 µl of GoTaq qPCR Mastermix (Promega) and 0.75 mM MgCl ₂
qPCR.is1081.131	CCAGCAAAGTCAATCGAAGG CGATGAACGTCGAGAGCAG FAM- TGTGCGAGTTGGTCAGCCAGAA- BHQ	600 nM for primers, 500 nM for probe, 12.5 µl of GoTaq qPCR Mastermix (Promega) and 4 mM MgCl ₂
qPCR.is6110.148	ATC ATT GCC ATT CCC TCT CC TTA TTC AAG GTT TCC GTC CCC FAM-GCCGA+CCAT+CCGCAT- IowaBlack	600 nM for primers, 500 nM for probe, 12.5 µl of GoTaq qPCR Mastermix (Promega) and 4 mM MgCl ₂

RESULTADOS

Das 33 amostras de leite informal, onze apresentaram alteração na densidade à 15° Celsius sendo dez abaixo de 1,028 preconizado pela legislação. Três amostras apresentaram concentração abaixo de 3% de gordura (Tabela 2).

Diante das análises de acidez titulável, cinco amostras apresentaram alcalinas com acidez abaixo de 0,14 gramas de ácido láctico/100mL (14° Dornic) e sete amostras estavam ácidas com graus acima de 0,18 gramas de ácido láctico/100mL (18° Dornic). Treze amostras (39,4%) e oito (24,24%) apresentaram sólidos não gordurosos e sólidos totais abaixo do preconizado pela legislação que é de 8,4 gramas/100mL e 11,4 gramas/100mL de leite, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 3 Parâmetros físico-químicos das amostras de leite informal

	Parâmetros	Mediana	Q ₁	Q ₃	Mínimo	Máximo
IN 76						
Gordura %	Mín. 3%	3,9	3,3	4,3	2,4	6

Densidade à 15°C	1,028 a	1,029	1,027	1,032	1,025	1,035
	1,034					
Acidez Dornic (°D)	14° à 18° D	16	15	18	11	20
Sólidos não gordurosos g/100g	Mín. 8,4 g	8,5	8,0	8,8	7,4	10,1
Sólidos totais g/100g	Mín. 11,4 g	12,2	11,4	13,0	10,6	15,0

Q₁ mediana dos dados que ficam para a esquerda da mediana

Q₂ mediana dos dados que ficam para a direita da mediana.

Quanto às provas de fraudes, quatro amostras apresentaram presença de bicarbonato de sódio com o intuito de neutralizar a acidez. Essas amostras apresentaram positividade no teste do alizarol e acidez titulável acima do permitido.

As análises biológicas demonstraram a falta de qualidade dos leites informais, apenas uma amostra não apresentou crescimento para *Staphylococcus aureus*. Todas as amostras tiveram crescimento de coliformes, aeróbios mesófilos acima do recomendado. Os principais agentes identificados foram aeróbios mesófilos com mediana de $7,3 \times 10^5$ UFC/mL. Apenas cinco não apresentaram crescimento de coliformes totais e uma amostra para *S. aureus*. Sete amostras (21,21%) apresentaram crescimento *E. coli* (Tabela 3).

Tabela 4 Parâmetros microbiológicos das amostras de leite informal.

	Mediana	Q₁	Q₃	Mínimo	Máximo
Coliformes totais (UFC/mL)	$5,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$	0	$3,0 \times 10^5$
<i>E. coli</i> (UFC/mL)	0	0	0	0	$1,5 \times 10^3$
<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	$8,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$2,85 \times 10^4$	0	$2,37 \times 10^6$
Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)	$7,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$2,51 \times 10^6$	$7,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^7$

Q₁ mediana dos dados que ficam para a esquerda da mediana

Q₂ mediana dos dados que ficam para a direita da mediana.

Com meio de cultura seletivo, foi realizado isolamento de três amostras suspeitas para *Brucella*. Porém após a realização do PCR AMOS foi verificado a positividade de uma amostra da cidade de Juiz de Fora – MG para *Brucella abortus* (*B. abortus*) biovar 3b, 5, 6 ou 9. Essa amostra foi positiva para *E. coli*. Com a realização do qPCR, para *Brucella*,

consideraram-se amostras suspeitas as que apresentam Cqs entre 37 até 40, com isso, 9 amostras apresentaram resultados inconclusivos, dentre essas nove amostras, três apresentaram crescimento para *E. coli* também. Já para *Mycobacterium bovis* todas as amostras analisadas foram negativas.

DISCUSSÃO

A falta de controle térmico na obtenção, no armazenamento, no transporte e durante a comercialização do leite favorece o crescimento de microrganismos, reduzindo assim a qualidade do produto. Deve ser mantido sob refrigeração, podendo chegar ao máximo a 9°C, como é exigido pela IN 76.

Todas as amostras de leite informal estavam acondicionadas em embalagens inapropriadas (sacos plásticos, garrafas pet e latões de alumínio) e sem estava refrigeração.

A má conservação do leite favorece o crescimento de microrganismos e reduz a qualidade do produto, portando as amostras demonstram a instabilidade da proteína diante do tratamento térmico.

Diversos parâmetros são estipulados em alimentos com finalidade de assegurar a qualidade dos produtos destinados aos consumidores. Em se tratando de leite no Brasil, a Instrução Normativa nº 76 de novembro de 2018 rege a normativa atual sobre leite cru refrigerado e pasteurizado exigindo que a densidade relativa à 15°C apresente padrões entre 1,028 a 1,034 e o mínimo de 3,0 gramas/100gramas (3%) de gordura (BRASIL, 2018).

A densidade é o peso específico do leite, determinando pela porcentagem de gordura presente e pela concentração de elementos em solução e suspensão; a densidade final do produto depende do balanço desses compostos. Apesar de não ser um parâmetro conclusivo para detecção de fraudes, é uma técnica útil para auxiliar na detecção de adição de água no leite.

Algumas amostras apresentaram menos de 3% de gordura, abaixo do recomendado pela legislação, demonstrando que o desnate parcial pode ter sido realizado na propriedade, o que é ilegal pelo RIISPOA (BRASIL, 2017a).

Parâmetros parecidos com o estudo atual foram apresentados por Silva et al. (2017) ao analisarem 24 amostras de leite informal comercializadas no município de Aparecida-PB sendo que 13 amostras (54,16%) apresentaram densidade fora dos parâmetros exigidos pela legislação, porém nenhuma amostra apresentou gordura inferior a 3% de gordura. Couto et al.

(2017) ao analisar cinco amostras de leite informal comercializado informalmente na cidade de Garanhuns-PE verificou uma única amostra com densidade abaixo do padrão estabelecido.

Silveira e Bertagnolli (2014) ao analisarem 10 amostras na cidade de Santa Maria-RS verificou que duas (20%) amostras estavam com densidade abaixo do recomendado, mas nenhuma estava com concentração abaixo de 3% de gordura.

Montanhini e Hein (2013) em Piraí do Sul – PR obteve 8/23 (34,78%) das amostras com densidade fora dos padrões e 21,74% das amostras com limites inferiores ao desejável para lipídeos no leite fluido. O desnate parcial ou total é permitido em laticínios e em granjas leiteiras que realizam todo o processamento (recepção, desnate, beneficiamento e envase) na propriedade.

A acidez Dornic é um parâmetro utilizado para verificação da qualidade do leite recebido pelas indústrias. A acidez titulável é recomendada entre 14° a 18° Dornic (0,14 a 0,18 gramas de ácido láctico).

O aumento da acidez pode ocorrer devido diversos fatores como animais com mastite clínica/subclínica, desbalanceamento nutricional ou do desdobramento da lactose em ácidos, elevando o aumento de ácidos orgânicos como o ácido láctico. A lactose é fermentada por microrganismos e eleva os níveis da acidez do leite. Assim, a acidez é um parâmetro utilizado para avaliar a carga bacteriana do leite e a qualidade sanitária do processo de obtenção e armazenamento.

No presente estudo, onde doze amostras apresentaram acidez fora do desejável, corroboraram com os dados obtidos por Silva et al. (2017) e Silveira e Bertagnolli (2014) que obtiveram 37,5% (9/24) e 80% (8/10) das suas amostras com acidez fora do padrão determinado pela legislação em vigor. Já Rocha, Oliveira e Carvalho (2016) em Barra do Bugres-MT analisaram seis amostras de leite informal e nenhum apresentou acidez fora do limite permitido.

Montanhini e Hein (2013) obteve 17% (4/23) das amostras com acidez elevada, indicando a fermentação da lactose e a liberação de ácido láctico no leite. A acidez do leite pode ocasionar a coagulação da caseína e limitar o uso do leite para processamento.

Outro parâmetro para determinar a qualidade e o rendimento do leite fluido dentro da indústria é a determinação do extrato seco total (EST) e o extrato seco desengordurado (ESD) de leite cru refrigerado que devem apresentar 11,4g/100g e 8,4g/100g respectivamente. Nas análises obtivemos oito amostras fora dos limites estabelecidos, essa alteração demonstra um produto com baixa composição nutricional o que interfere no rendimento para elaboração de

subprodutos lácteos.

Dados de Silva et al. (2017) corroboram com os dados obtidos, onde 33,33% (8/24) das amostras apresentaram parâmetros de extrato seco total e 62,5% (15/24) de amostras com extrato seco desengordurado fora dos padrões estabelecidos juntamente como Montanhini e Hein (2013) que obtiveram quase metade das amostras (48% -11/23) fora dos parâmetros podendo suspeitar de fraude com adição de reconstituintes e água na composição das amostras.

Parâmetros físico-químicos são utilizados com o intuito de determinar a qualidade do produto comercializado, apesar desses parâmetros alterados não ocasionarem prejuízos à saúde do consumidor, é um fato de extrema importância, pois demonstra que o produto está fora do recomendado pela legislação, infringindo o direito do consumidor, pois esses consumidores são enganados ao consumirem um produto de qualidade inferior.

Com intuito de mascarar a má qualidade do leite ou realizar adição de compostos com finalidade de aumentar o volume e a vida útil do produto, alguns vendedores realizam a adição de diversos compostos não permitidos como amido, peróxido de hidrogênio, formol, bicarbonato de sódio entre outros.

O leite que recebe acréscimo de água em sua composição tem sua densidade alterada, com o intuito de corrigir essa densidade, utiliza-se o emprego de amido no leite. A adição de peróxido de hidrogênio é considerada uma fraude grave por mascarar a qualidade higiênica do leite, tendo em vista que esta substância inibe o crescimento de microrganismos deteriorantes, evitando a acidificação do leite e elevando a vida útil do produto lácteo.

Montanhini e Hein (2013); Paula, Cardoso e Rangel (2010); Rocha, Oliveira e Carvalho (2016) e Silva et al. (2017), analisaram as amostras para substâncias como amido, peróxido de hidrogênio e nenhuma apresentou positividade nas análises diferentemente do verificado no presente trabalho que detectou presença de bicarbonato em quatro amostras.

A prova do alizarol é uma metodologia rápida não oficial, mas realizada pelos freiteiros no momento da coleta do leite nas fazendas e nas plataformas de recepção dentro dos laticínios como indicador de acidez e estabilidade térmica do leite. A análise verifica se as proteínas presentes no leite estão estáveis para sofrerem o tratamento térmico. A estabilidade térmica reduzida gera transtorno durante o beneficiamento, podendo ocorrer floculação do leite, ocasionando prejuízos à indústria.

Corroborando com os dados encontrados no presente trabalho, Montanhini e Hein (2013) verificaram também presença de 9% (2/23) das amostras positivas para análise com o

alizarol, indicando instabilidade do leite ao calor.

Segundo a legislação vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a conservação do leite fluido durante seu transporte deve atingir até seu estabelecimento deve atingir a temperatura máxima de 7°C (BRASIL, 2018). A qualidade microbiológica e a temperatura empregada são os fatores primordiais na multiplicação de bactérias indesejáveis.

Contagens elevadas de bactérias podem interferir diretamente na qualidade do leite e dos produtos finais, devendo haver um controle rigoroso da limpeza e higienização dos tetos dos animais, pessoal, ambiente, equipamentos e utensílios, a fim de reduzir a contaminação do leite.

Segundo a IN 76/2018 leite cru refrigerado deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL, isso garante uma qualidade do leite beneficiado e uma produção de derivados de qualidade (BRASIL, 2018).

Os aeróbios mesófilos são microrganismos frequentemente isolados e usados como indicadores de qualidade microbiológica de leite e produtos lácteos. Através desses agentes bacterianos podemos obter informações sobre as condições sanitárias e higiênicas de ordenha, do armazenamento e processamento do leite (FREITAS; NERO; CARVALHO, 2009).

O presente trabalho todas as amostras apresentaram crescimento positivo para aeróbios mesófilos, quantidade essa bem superior ao preconizado pela legislação que preconiza a Contagem Padrão em Placas no máximo $3,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Motta et al. (2015) constataram valores parecidos com os valores obtidos no presente trabalho ao realizar a análise de 100 amostras de leite, 86% estavam em desacordo com a legislação vigente na época (IN 62) que previa a contagem máxima $6,0 \times 10^5$ UFC/mL

Silveira e Bertagnolli (2014) tiveram todas às dez amostras positivas para aeróbios mesófilos, variando entre $7,5 \times 10^1$ a $1,36 \times 10^6$ e 30% estavam fora dos parâmetros estabelecidos pela IN 62.

Quintana e Carneiro (2006) e Villa (2008) verificaram que em 71,4% e 77,2% das amostras de leite cru analisadas, apresentaram valores de contagem de bactérias mesófilas superior a 10^5 UFC/mL e 10^6 UFC/mL respectivamente.

Colônias de coliformes totais e de *E. coli*. produzem beta-glicuronidase e gás devido fermentação da lactose tornando-se um fator relevante para verificação da qualidade do produto coletado e consumido. Após as análises verificou-se que apenas cinco (15,15%)

amostras de leite informal não apresentou crescimento de coliformes totais. O tratamento térmico empregado pelas indústrias de beneficiamento do leite realizam a pasteurização ou a *Ultra High Temperature* (UHT), que ocasiona a eliminação desses microrganismos, tornando o alimento apto ao consumo, livre de perigos biológicos a saúde do consumidor.

As amostras com contagens negativas para coliformes totais e *E. coli* poderm receber algum tipo de tratamento térmico, como fervura. Alguns vendedores realizam a fervura do leite com o intuito de conservar o produto por mais tempo, podendo assim comercializar o leite durante o dia todo, pois é mantido sem refrigeração, muitas vezes no sol quente. Um ponto negativo da fervura é desnaturação das proteínas do leite, tornando-o um produto nutricionalmente inferior.

Nas análises realizadas observa-se que sete amostras (21,21%) apresentaram crescimento de *E. coli* essas amostras podem estar contaminadas com os mais diversos patógenos que podem ser carreados pelas fezes. Essa constatação é de grande importância sanitária, visto que esse agente é indicativo de contaminação fecal das amostras e, portanto, está fortemente associado a casos de gastroenterite ou doenças de transmissão de importantes patógenos feco-oral em seres humanos.

De uma dessas amostras foi isolada *Brucella abortus*, que é um patógeno de importância pela condição incapacitante da brucelose e a dificuldade de diagnóstico, que faz com que essa doença seja extremamente subnotificada e negligenciada. Além disso, 11 amostras foram consideradas suspeitas, inconclusivas para *Brucella*. Isso demonstra o risco de transmissão de agentes zoonóticos em alimentos contaminados por fezes e não tratados termicamente.

Rocha, Oliveira e Carvalho (2016) após analisar três amostras de leite cru tipo A, três amostras de leite cru tipo B e nove amostras de leite pasteurizado verificou taxas significativas de coliformes termotolerantes, apresentando 40,33 NMP/mL, 13 NMP/mL e 6,9 NMP/mL respectivamente, valores superiores ao recomendado pela RDC nº12 de 2001 que estabelece 4NMP/mL para leite.

Silveira e Bertagnolli (2014) obtiveram 70% (7/10) das amostras de leite com contagem 10^2 e 30% (3/10) com 10^3 NMP/mL das amostras analisadas respectivamente. Para determinação de coliformes termotolerantes foi verificado em 50% das amostras com níveis de 10^2 NMP/mL. Scabin, Kozusny-Andreani e Frias (2012) em estudo realizado em São Paulo obteve também a maioria das amostras positivas (53,33%-64/120) contaminadas por coliformes totais e 35% por coliformes termotolerantes e *E. coli*.

Souza, Nogueira e Nunes (2011) obtiveram todas as dez amostras de leite cru positivas para coliformes totais, sendo sete amostras com limites acima do permitido pela legislação vigente na época (variando 9,2 até 460 NMP/mL). Quintana e Carneiro (2006) verificaram que 23,8% das amostras eram positivas para coliformes termotolerantes e 33% para coliformes totais.

Em uma análise comparativa com 141 amostras de leite pasteurizado foi realizada Cirolini et al. (2014) utilizando a metodologia convencional, sistema Petrifilm™ HS e Petrifilm™ EC para coliformes a 35°C obteve uma associação linear positiva após os resultados obtidos 34,7% (49/141), 47,5% (67/141) e 36,2% (51/141) respectivamente.

A alta incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de leite cru pode ser consequência, entre outros fatores, da mastite bovina, pois o *Staphylococcus* é o agente mais frequentemente isolado em animais com esse tipo de enfermidade.

O *Staphylococcus* coagulase positiva, tem também como reservatório natural, a pele dos quartos do úbere e tetos da vaca e pode ser veiculado pelo ordenhador de um animal para o outro durante a retirada do leite.

Um fator agravante é que o leite, quando armazenado e exposto para os consumidores em estabelecimentos comerciais ou nas ruas, não é mantido sob temperatura de refrigeração, o que favorece o desenvolvimento de *Staphylococcus* e de outros microrganismos (MARTINS et al., 2016; SILVA et al., 2000).

Mesmo que o consumidor ferva o leite cru, o aquecimento não garante a destruição de todas as toxinas bacterianas termoestáveis como as enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus*, microrganismo presente no leite cru, principalmente oriundos animais com mastite (SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2014).

No estudo realizado apenas uma das amostras de leite informal não apresentou crescimento de colônias de *S. aureus*. A média obtida nas amostras de leite cru foi de $8,6 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 5).

Artursson et al. (2018) analisaram 103 amostras de leite em dois períodos distintos e verificaram a presença de *S. aureus* em 71% das amostras de leite bovino e 64% em leite caprino, demonstrando a facilidade de detecção desse agente bacteriano em diversos tipos de leite.

Martins et al. (2016) analisaram 120 amostras de leite cru comercializadas nas ruas do município de Açailândia –MA obtiveram 100% das amostras positivas para *Staphylococcus* sp. sendo 420 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas. Os valores para as contagens

de *Staphylococcus* coagulase positiva tiveram média de $4,6 \times 10^5$ UFC/mL. e o *Staphylococcus* sp. valor médio de $9,0 \times 10^6$ UFC/mL. Este nível de contaminação é considerado alto e pode favorecer a produção de enterotoxinas sob condições ambientais adequadas. Esta contaminação pode ser explicada pela diversificação de sistemas de produção e de manejos utilizados pelos produtores, o que leva à maior ou menor contaminação do leite por *Staphylococcus* devido à mastite e/ou por contaminação pelos ordenhadores portadores assintomáticos.

Os estafilococos existem no ar, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou equipamentos que processam alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios (REZER, 2011).

Nos meses de maior concentração de chuvas (março e abril) no Brasil, pode-se ter uma frequência maior de isolamento de *S. aureus* devido à dificuldade de se manter as condições higiênico-sanitárias adequadas (FERREIRA et al., 2006). Justificando os dados encontrados por Scabin, Kozusny-Andreani e Frias no ano de 2012 que verificou 76,6% das amostras com presença de *S. aureus* com contagem superiores a 10^6 UFC/mL nos meses de março e abril.

Souza, Nogueira e Nunes (2011) ao analisar 10 amostras de leite, detectou a presença de 8 amostras contaminadas por *Staphylococcus* sp. As colônias suspeitas foram submetidas à coloração de Gram e à prova da catalase, pois bactérias desse gênero produzem a enzima catalase que converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sendo a reação positiva quando ocorre o borbulhamento. O *S. aureus* foi identificado em três das oito amostras positivas.

S. aureus foi o patógeno mais encontrado em leite e produtos lácteos importados ilegalmente (7,4%), muitas vezes em concentrações médias ($> 10^6$ UFC/g). Por produzir níveis perigosos de toxinas estáveis ao calor em concentrações mais altas, produtos derivados do leite contaminados e importados ilegalmente, podem representar um risco para saúde pública gerando diversos surtos na população (JANSEN et al., 2019).

Todas as amostras analisadas para *Salmonella* sp. foram negativas, corroborando com os dados encontrados por Scabin, Kozusny-Andreani e Frias (2012) e Silveira e Bertagnolli (2014) que não verificaram presença desses microrganismos nas 10 e 120 amostras de leite avaliadas respectivamente.

Tratando-se de zoonoses, a brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa que acomete os animais e os seres humanos, por se tratar de uma enfermidade grave. Alguns países do norte da União Europeia, Austrália, Canadá e Nova Zelândia conseguiram a erradicação da

doença em seu território. Porém, na América Latina, Oriente Médio, Norte e Leste da África e Ásia Central e do Sul, a brucelose ainda representa uma das doenças economicamente importantes.

Com o intuito de reduzir a prevalência e a incidência da brucelose e tuberculose em bovinos e bubalinos o MAPA criou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT).

A Instrução Normativa SDA nº 10 de 03 de março de 2017 estabelece revisões no PNCEBT, determinando a obrigatoriedade da vacinação em todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, na faixa etária de três a oito meses, utilizando-se dose única de vacina viva liofilizada, elaborada com amostra 19 de *Brucella abortus*, chamada como vacina B19. Sendo essas fêmeas vacinadas marcadas no lado esquerdo da face com ferro candente ou nitrogênio líquido (BRASIL, 2017b).

A vacina contra brucelose não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 pode ser aplicada em fêmeas acima de oito meses de idade ou ser a substituta da B19 na espécie bovina, devendo ser realizada de preferência por um veterinário cadastrado (BRASIL, 2017b).

Animais doentes eliminam a bactéria através do leite e no ambiente através dos resíduos oriundos dos partos e abortos. O leite cru comercializado informalmente, assim como o consumo de produtos lácteos feitos com leite cru, representa o principal fator de risco para a saúde dos seres humanos (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), diversas doenças bacterianas e viróticas são veiculadas pelo leite cru devido qualidade baixa dos produtos comercializados informalmente. Dentre as principais doenças zoonóticas estão a tuberculose, brucelose e gastroenterites (CLAEYS et al., 2013; MONTANHINI; HEIN, 2013).

No Brasil, infelizmente, *Brucella* spp pode ser encontrada e isolada em produtos de origem animal, como em produtos lácteos elaborados a partir do leite cru (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019; JANSEN et al., 2019).

Uma técnica amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas em medicina humana e veterinária é a análise através da biologia molecular, por ser uma análise com alta sensibilidade e especificidade, aliado à rapidez da resposta diagnóstica. Como exemplo dessa técnica possuímos o PCR, PCR AMOS e o PCR em tempo real (qPCR).

Bricker e Halling em 1994 desenvolveu um PCR multiplex denominado AMOS com o objetivo de diferenciar as espécies de *Brucella*. Foram utilizados cinco *primers* capazes de

identificar todos os biovars de *B. ovis*, os biovars 1, 2 e 4 de *Brucella abortus*, três biovars de *B. melitensis* e o biovar 1 de *B. suis*. Este ensaio explora o polimorfismo decorrente da localização espécie-específica do elemento genético is711 no cromossomo de *Brucella*.

A PCR multiplex utiliza vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano em uma mesma reação. Pode ser utilizada na diferenciação entre as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do complexo *Mycobacterium avium*, de outras micobactérias atípicas e entre espécies de bactérias de um mesmo gênero (YEBOAH-MANU et al., 2001; PARRA et al., 31 2008).

A PCR em tempo real (qPCR) fundamenta-se na utilização de compostos fluorescentes que geram um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, sendo possível assim, acompanhar a amplificação do fragmento alvo durante os ciclos da PCR. Com isso, a qPCR tem como vantagem maior acurácia, precisão, reprodutibilidade, melhor controle na qualidade da análise, melhor velocidade das análises e objetividade na interpretação dos resultados, por se tratar de um tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações (NOVAIS et al., 2004; RODRIGUEZ - LÁZARO et al., 2007).

Melo et al. (2014) em um estudo realizado nos aeroportos internacionais em São Paulo e no Rio de Janeiro, a *Brucella* spp. foi detectada por métodos moleculares em 42% (70/166) de produtos lácteos importados ilegalmente. A alta taxa de detecção de *Brucella* spp. em leite contaminado fornece informações importantes para avaliação de risco que a população está exposta para a ocorrência de brucelose (DADAR; SHAHALI; WHATMORE, 2019).

Na Turquia um estudo foi realizado por Babaoglu et al. (2018) com 202 amostras de leite de vaca para a presença de *B. abortus*, sendo realizado o teste do anel do leite (TAL) em todas as amostras coletadas, sendo 34,15% identificadas como positivas. Após análise de semeadura, 17,32% das amostras de leite cru foram identificadas como suspeitas.

Dados de prevalência de brucelose são encontrados em diversos países, tornando-se um importante problema de saúde pública e veterinária. Faz-se necessário um acompanhamento da distribuição e da prevalência das doenças zoonóticas no território brasileiro com o objetivo de realizar projetos de prevenção contra essas doenças. Melhorias na inspeção de produtos de origem animal, um controle higiênico-sanitário eficaz e a conscientização da população sobre os riscos do consumo de leite cru são medidas primordiais a fim de reduzir a ocorrência da doença na população.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a venda de leite informal representa um risco real à saúde pública, uma vez que foram constatados indícios de fraudes e frequente contaminação, inclusive de origem fecal, e presença de patógenos importantes, como *S. aureus*, *E. coli* e *B. abortus*.

O controle de qualidade microbiológica do leite e produtos lácteos é extremamente importante para a saúde do consumidor.

Faz-se necessário a conscientização da população sobre a importância do consumo de produtos de origem animal inspecionados.

REFERÊNCIAS

- 3M DO BRASIL. Petrifilm. **Guia de interpretação para Contagem expressa de *Staphylococcus aureus***, USA. Disponível em: <<http://multimedia.3m.com/mws/media/5868600/guia-placa-petri-staph-express.pdf?&fn=PetrifilmStaphExpressSTX.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- ARAÚJO, C. G. F. et al. Avaliação qualitativa do leite pasteurizado Tipo A, B, e C comercializado em Natal. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 283-286, abr./jun. 2012.
- ARTURSSON, K. et al. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 284, p. 120-127, Nov. 2018.
- BABAUGLU, U. T. et al. Prevalence of Brucella in raw milk: An example from Turkey. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 21, n. 7, p. 907-911, 2018.
- BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 29 de março de 2017a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa SDA n. 10, de 03 de março de 2017**. Dispõe sobre Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília, n. 116, Seção 1, p. 4-8, 2017b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, n. 230, Seção 1, p. 9, 2018.
- BRICKER, B. J.; HALLING, S. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.
- CIROLINI, A. et al. Avaliação do sistema Petrifilm™ HS na contagem de coliformes em leite pasteurizado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 298-301, 2014.
- CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 251-262, May 2013.
- COUTO, K. S. et al. Avaliação de leite cru comercializado informalmente na cidade de Garanhuns –PE – Brasil. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 1, p. 09-12, 2017.
- DADAR, M.; SHAHALI, Y.; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 292, p. 39-47, Mar. 2019.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n. 4, p. 1228-1234, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005, 196p.

FREITAS, R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Technical note: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3069-3073, July 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Trimestral do Leite. 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2019_3tri.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2019a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/juiz-de-fora/panorama>>. Acesso em: 22 dez. 2019b.

JANSEN, W. et al. Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. **Veterinary Journal**, London, v. 244, p. 75-82, Feb. 2019.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 1, p.167-188, Fev. 1981.

MARQUES, M. S.; COELHO JUNIOR, L. B.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” processado no estado de Goiás. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO E VII BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2, 2005, Búzios. **Anais...** Búzios, 2005.

MARTINS, A. G. L. de A. et al. Avaliação da contaminação do leite cru comercializado nas vias públicas do município de Açailândia - MA por *Staphylococcus coagulase* positiva. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 256/257, p. 94-98, maio/jun. 2016.

MELO, C. B. de. et al. Profile of international air passengers intercepted with illegal animal products in baggage at Guarulhos and Galeao airports in Brazil. SpringerPlus, v. 3, n. 1, p. 69, Feb. 2014.

MONTANHINI, M. T. M; HEIN, K. K. Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Piraí do Sul, Estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 10-14, jul./ago. 2013.

MOTTA, R. G. et al. Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 5, p. 417-423, maio 2015.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, ed. 33, jun-dez 2004.

OLIVEIRA, E. N. A. de.; SANTOS, D. da C. Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 193-197, 2012.

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; MENDOZA, J. H. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 315-324, 2008.

PAULA, F. P. de.; CARDOSO, C. E.; RANGEL, M. A. C. Análise Físico-química do Leite Cru Refrigerado Proveniente das Propriedades Leiteiras da Região Sul Fluminense. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, v. 3, n. 4, p. 7- 17, out./dez. 2010.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 194-198, set./dez. 2006.

REZER, J. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 19, p. 50-59, 2011.

ROCHA, K. L.; OLIVEIRA, A. P. de.; CARVALHO, J. W. P. Avaliação da qualidade do leite “in natura”, pasteurizado e esterilizado (UHT), comercializado em Barra do Bugres-MT. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 114-126, 2016.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZTKO, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v. 18, p. 306-319, 2007.

SALVADOR, F. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Revista F@pciência**, Apucarana-PR, v. 9, n. 5, p. 30-41, 2012.

SCABIN, K. E. M.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FRIAS, D. F. R. Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após o resfriamento. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 7, n. 1, p. 11-21, enero/junio 2012.

SCHUSTER, C. et al. Avaliação de equipamento alternativo para pasteurização lenta de leite previamente envasado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 26, n. 4, p. 828-831, out./dez. 2006.

SEBRAE. **Cenários para o leite e derivados na região nordeste em 2020**. Recife, 2013. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/Anexos/estudo->

Cenários-para-leite-e%20derivados-NE.pdf>. Acessado em 02 de julho 2019.

SILVA, G. W. N. da. et al. Avaliação físico-química de leite *in natura* comercializado informalmente no sertão paraibano. **Revista Principia**, João Pessoa, n. 35, p. 34-41, jun. 2017.

SILVA, M. C. D. da. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2008.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SILVA, W. P. da. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilians dairy farms. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v.31, n. 2, p.103-106, Apr./June 2000.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Visa em Debate**, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

SOUZA, F. M.; NOGUEIRA, M. S.; NUNES, F. da C. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado informalmente na cidade de Areia-PB. **Agropecuária Técnica**, v. 32, n. 1, p. 168-171, 2001.

TONINI, C. B. **Avaliação da qualidade do leite e caracterização de laticínios do estado do Espírito Santo**. 2014. 123 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

VILLA, F. B. Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite *in natura* comercializado informalmente em Brotas, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 158, p. 98-103, jan./fev. 2008.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004.

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple Multiplex PCR to aid in routine work of the Mycobacterium reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001.