



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



Otto Cabral Portela

**Detecção molecular de *Brucella sp.* em leite “informal” comercializado nos municípios
de Alagoas.**

RIO LARGO-ALAGOAS-BRASIL

2016

OTTO CABRAL PORTELA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Brucella sp.* EM LEITE “INFORMAL”
COMERCIALIZADO NOS MUNICÍPIOS DE ALAGOAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Patrícia Mendes Guimarães Beelen

RIO LARGO-ALAGOAS-BRASIL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

P843d	<p>Portela, Otto Cabral. Detecção molecular de <i>Brucella sp.</i> em leite “informal” comercializado nos municípios de Alagoas / Otto Cabral Portela. – 2016. 57 f. : il., tabs.</p> <p style="text-align: center;">Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros. Coorientadora: Patrícia Mendes Guimarães Beelen. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Rio Largo, 2016.</p> <p style="text-align: center;">Inclui bibliografia.</p> <p style="text-align: center;">1. Leite – Comercialização – Alagoas. 2. Leite – Contaminação. 3. Brucelose. 4. Leite – Análise. 5. Reação em Cadeia Polimerase em tempo real (PCR). I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 637.12</p>
-------	---

TERMO DE APROVAÇÃO

OTTO CABRAL PORTELA

DETECÇÃO MOLECULAR DE BRUCELLA sp. EM LEITE “INFORMAL” COMERCIALIZADO NOS MUNICÍPIOS DE ALAGOAS

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 26/01/2016



Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Orientadora (UFRPE)



Prof^ª. Dr^ª. Karla Patricia Chaves
Membro (UFAL-VIÇOSA)



Prof^ª. Dr^ª. Julicelly Gomes Barbosa
Membro UFAL-VIÇOSA)

Rio Largo – AL

2016

Aos meus pais, Dinaldo Vandavelde Portela (*in memoriam*) e Célia Cabral Portela, pelo amor incondicional, exemplos, aprendizados, oportunidades e vida, além de fazer de meus sonhos, seus sonhos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por me proporcionar a vida. O discernimento do certo e do errado e a oportunidade do livre arbítrio, bem como, todas as oportunidades que me levaram a mais este projeto.

Agradeço a meus pais, Dinaldo Vandavelde Portela (*in memoriam*) e Célia Cabral Portela, pela formação do meu caráter e condução de minha vida e todas as ótimas oportunidades e momentos de aprendizado e felicidade. Obrigado pelos sacrifícios que fizeram em me dar esta maravilhosa vida.

Agradeço a minha amiga e orientadora Prof. Dr.^a. Elizabeth Sampaio, pelos estímulos ao mestrado, orientação e muita paciência.

Agradeço a minha filha Letícia Pereira Portela pela ajuda nas traduções e apoio, bem como, sua mãe Sandra Alice de Almeida Pereira que sempre estimulou, esteve presente em boa parte de minha vida, apoiando este e outros projetos.

Agradeço a meus familiares, principalmente na pessoa do meu irmão Daniel Cabral Portela, que sempre em suas oportunidades perguntava interessado no andamento do mestrado e quando será a defesa.

Agradeço aos amigos que construí, todos os que conheci, e muitos me ajudaram neste projeto. Minha turma do mestrado, amigos do Laboratório de Bacterioses da UFRPE e tantos outros desta jornada. Minha amiga Pomy Kim, meu muito obrigado pelo apoio, auxílio e orientação ao PCR.

Agradeço a todos os professores e mestres que tive muitos desde a graduação e que ainda temos a oportunidade de trocarmos informações, a exemplo do Prof. Rinaldo Aparecido Mota que nos ajudou bastante, inclusive abrindo o espaço do Laboratório de Bacterioses da UFRPE contando com o apoio de toda equipe de lá. Além outros professores como a Prof. Dr.^a. Patrícia Beleen (Coorientadora) e seu esposo Prof. Dr. Roger, como os demais professores do mestrado sempre dispostos a um apoio, orientação ou estímulo.

Agradeço a Girlene da Silva Monteiro Brandão pelo apoio e companheirismo, nas viagens em colheitas de amostras, espaços na geladeira e auxílio na organização do material de coleta, dentre outras presenças.

Agradeço aos colegas Jailton, Flávio e Felipe pela constante parceria e companheirismo durante o mestrado.

Agradeço a Medicina Veterinária, profissão que abracei e venho com esforço devolvendo a sociedade o que recebi como formação da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Agradeço ao Programa de Mestrado em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias – UFAL / CECA.

Agradeço aos colegas da Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas –ADEAL pelo apoio e estímulo, principalmente nas coletas de material.

Agradeço a Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas –ADEAL pela disponibilidade dispensada no desenvolvimento dessa jornada.

Agradeço ao SINFEAGRO que nos ajudou no processo da matrícula.

Encerro agradecendo a todos que contribuíram de forma direta ou indireta neste projeto e em minha formação.

Muito obrigado e que Deus abençoe a todos!

"quem persiste na luta acaba triunfando!"

Helenira Rezende

RESUMO

Objetivou-se com este estudo detectar o comércio informal de leite bovino, Leite “*in natura*”, no Estado de Alagoas e a presença de *Brucella sp.* através da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) em tempo real. Foi realizado um levantamento das cidades que realizavam comércio de leite informal com a aquisição de amostras do produto comercializado na apresentação da venda. O leite obtido foi mantido e transportado sob refrigeração para o laboratório, posteriormente as amostras foram homogeneizadas e retiradas alíquotas de 50 mL acondicionadas em tubos FALCON, devidamente identificados e congeladas, para serem processadas no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Encontrou-se 100 pontos de venda em 80 municípios do estado de Alagoas. Com a extração do DNA e a realização da PCR detectou-se a presença de *Brucella sp.* em uma das amostras 1% (1/100), a partir de análise estatística descritiva por conveniência. Conclui-se com este estudo que existe comércio ilegal do leite em Alagoas e a presença da *Brucella sp.* em leite bovino, que pode representa um risco potencial de transmissão da Brucelose para população que consome o leite comercializado informalmente.

Palavras-chaves: Brucelose. Leite informal. Leite “*in natura.*” PCR.

ABSTRACT

The objective of this study to detect the informal trade in bovine milk, milk "*in natura*" in the state of Alagoas and the presence of *Brucella sp.* by Polymerase Chain Reaction (PCR) in real time. A survey of cities that held informal milk trade with the acquisition of samples of the product marketed in the presentation of the sale was realized. The obtained milk was kept and transported under refrigeration to the laboratory, then the samples were homogenized and withdrawal rates of 50 mL packaged in FALCON tubes, properly identified and frozen, to be processed at the Laboratory of Infectious of Domestic Animal Diseases, University Federal Rural de Pernambuco. It was found 100 outlets in 80 cities in the state of Alagoas. With DNA extraction and PCR analysis detected the presence of *Brucella sp.* of the samples in 1% (1/100) from analysis descriptive statistics for convenience. It is concluded from this study that there is illegal trade in milk in Alagoas and the presence of *Brucella sp.* in bovine milk, which can pose a potential risk of transmission of brucellosis to the population that consumes the milk marketed informally.

Keywords: Brucellosis. informal milk. milk "*in natura*". PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Distribuição da Brucelose em animais no mundo.....	36
FIGURA 02 – Mapa de distribuição das amostras.....	49
FIGURA 03 – Eletroforese em gel agarose a 2% amplificados por PCR.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Produção Leiteira – Brasil – Evolução em 10 Anos.....	19
TABELA 02- Crescimento na produção de leite em diferentes períodos analisados.....	20
TABELA 03- Produção de origem animal - Ranking descendente por região.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTAs - Doenças Transmitidas por Alimentos

FDA - Food and Drug Administration

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Faostat - The Statistics Division of FAO

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INDEA - Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso

RNA - Ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

µL – Microlitro (0,001 mL)

mL – Mililitros (0,001 L)

OIE – Organização Internacional de Saúde Animal

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PB – Pares de base

PNCEBT - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose

PPM – Pesquisa Pecuária Municipal

RIISPOA - REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	14
2	OBJETIVOS -----	17
2.1	Objetivo geral -----	17
2.2	Objetivo específico -----	17
3	REVISÃO DE LITERATURA -----	18
3.1	Importâncias sócio econômicas do leite -----	18
3.2	O Mercado do leite -----	22
3.2.1	Comércio informal do leite -----	23
3.2.2	Riscos decorrentes do consumo de leite informal -----	25
3.2.3	Transmissão da <i>Brucella sp.</i> pelo leite -----	27
3.3	Brucelose (<i>Brucella sp.</i>) -----	28
3.3.1	Brucelose (<i>Brucella sp.</i>) em seres humanos -----	29
3.3.2	Brucelose (<i>Brucella sp.</i>) em Bovinos -----	32
3.4	Reação em cadeia polimerase (PCR) -----	36
	REFERÊNCIAS -----	38
4	ARTIGO -----	48
	Detecção molecular de <i>Brucella sp.</i> em leite “informal” comercializado nos municípios de Alagoas, Região Nordeste do Brasil.	
4.1	Introdução -----	48
4.2	Material e métodos -----	49
4.2.1	Amostras biológicas -----	49
4.2.2	Metodologia (Biologia Molecular) -----	50
4.2.2.1	Extração de DNA -----	50
4.2.2.2	Detecção do DNA de <i>Brucella sp.</i> pela PCR -----	50
4.3	Resultados -----	51
4.4	Discussão -----	51
4.5	Conclusão -----	54
	REFERENCIAS -----	55

1 INTRODUÇÃO

O leite é produzido em quase todos os países do mundo, importante fonte de proteínas para a alimentação humana, com grande quantidade de cálcio, vitaminas, gordura, entre outras (RIBEIRO NETO et al., 2012). Os principais países produtores de leite do mundo são Estados Unidos com 90.865.000 T, Índia com 54.000.000 T, China Continental com 37.419.500 T, Brasil com 32.304.421 T e Rússia com 31.576.047 T (FAO, 2012). O Brasil, a Índia, a China e a Rússia, além de serem grandes produtores de leite, são também grandes importadores de lácteos e suas produções estão voltadas principalmente para atender o consumo interno que é de grandes proporções e estão em crescente expansão (EMBRAPA, 2012).

A produção nacional de leite cresceu 123,03%, entre 1990 e 2012, e atingiu 32,3 bilhões de litros, o que corresponde a taxa de 3,81% ao ano. A região Norte tem exibido crescimento importante nesse contexto, com a maior taxa, entre as grandes regiões do país (5,84% a.a). Com esse ritmo de crescimento a região passou a responder por 5,13% do total nacional, em 2012, e superou os 3,83% do início da década de 1990. As outras duas regiões que exibiram crescimento superior à média nacional foram o Sul (5,58% a.a) e o Centro-Oeste (4,56% a.a). Nas regiões Nordeste e Sudeste, as taxas foram 3,59% a.a e 2,25% a.a, respectivamente (IBGE, 2013).

A importância social do sistema agro-industrial do leite é uma das maiores do país, pois a atividade é praticada em todo o território Nacional fato que gera empregos e benefícios diretos e indiretos, agrega mais de seis bilhões a produção agropecuária Nacional (VILELA et al., 2002).

No Brasil existe uma diversidade de formas ou modelos de produção de leite, sistemas com diferentes graus de especialização desde propriedades de subsistência, utilizando pouca ou nenhuma tecnologia, com produção diária reduzida a menos de dez litros dia, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, usando tecnologias avançadas e produção diária superior a 50 mil litros/dia (ZOCCAL, 2006).

A cadeia do leite em Alagoas, principalmente em sua área de maior concentração, o Semiárido, gera ocupação e garante renda para muitas famílias. No Estado, é muito forte a produção do leite bovino, respaldada pelo processo histórico de colonização vivenciada na região do Agreste e do Sertão (ALMEIDA, 2012).

O comércio informal do leite faz parte da economia regional e segue características próprias de cada região, conferem a sistemas de produção de subsistência onde o excedente do consumo para o produtor e família é comercializada diretamente com o consumidor final sem nenhum tipo de tratamento (BELLOTI, 2001). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o comércio informal de leite uma grande ameaça a saúde pública, visto que diversas doenças podem ser veiculadas pelo produto dentre elas a brucelose, tuberculose e gastroenterites (BADINI et al., 1997).

A brucelose é considerada uma zoonose e a identificação nos animais e no sistema de produção são essenciais para a prevenção da doença em humanos (NOCITI et al., 2008). A enfermidade é de caráter crônico e atinge indivíduos que trabalham com animais, diretamente nos sistemas de produção o que a caracteriza como uma enfermidade ocupacional, porém ocorre ainda a transmissão pelo consumo de alimentos de origem animal, carne e principalmente leite e derivados. (ACHA; SZYFRES, 2001).

A doença é uma antropozoonose conhecida a épocas remotas. Há registros de pacientes com sintomas compatíveis em 460 a.C. (CAPASSO, 2002). O gênero *Brucella sp.* é composto por nove espécies das quais a *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus* são espécies lisas e altamente patogênicas, responsáveis pela brucelose principalmente em Caprinos, Ovinos, Suínos e Bovinos, como também no Homem (CORBEL, 2006)

No Brasil, são raros os estudos bem planejados e de grande abrangência sobre a situação da brucelose bovina. O último levantamento epidemiológico Nacional ocorreu em 1975 (BRASIL, 1977), posteriormente apenas cinco Estados realizaram trabalhos em todo o seu território e com o uso de diferentes tecnologias (POESTER et al., 2002). Portanto, a situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil não é conhecida (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza alguns métodos de diagnóstico, como: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Teste do Anel do Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC) (BRASIL, 2004). Outras técnicas podem ser empregadas para o diagnóstico da brucelose, algumas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que vem se destacando na identificação do DNA de microorganismos em amostras de leite e outros alimentos (AHAMADI et al., 2010). A PCR é um método de amplificação do DNA *in vitro* amplamente utilizado, o desenvolvimento da técnica ocorreu em meados de 1980, por Karry Mullis, pode ser aplicada em diferentes áreas de conhecimento, principalmente na pesquisa de doenças infecciosas (YANG et al., 2004).

Justifica-se este estudo para a detecção do comércio informal do leite em Alagoas, pois ainda não está bem estabelecida a informalidade nesse comércio, além de pesquisar através da PCR a presença de *Brucella sp.* no leite “*in natura*” comercializado, haja vista a relevante importância quanto ao aspecto de produção do leite bovino e riscos à saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a presença de DNA de *Brucella sp.* em amostras de leite “*in natura*” adquiridas no comércio informal em municípios Alagoanos.

2.2 Objetivo específico

Detectar o comércio informal de leite em municípios Alagoanos;

Pesquisar a presença de DNA de *Brucella sp* pela técnica de PCR em amostras de leite obtidas em pontos de comércio informal no estado de Alagoas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importâncias sócio econômicas do leite

A cadeia produtiva do leite tem uma perspectiva concreta do aumento do consumo pela necessidade de aumento na produção mundial de leite que está aquém da média litro/dia do consumo por pessoa. A FAO recomenda o valor mínimo de 146 litro/pessoa/ano, sendo que, segundo pesquisas realizadas em 74 países, existem 224 milhões de vacas ordenhadas que produzem 455 bilhões de litros de leite por ano. Essa quantidade distribuída equitativamente entre 5,6 bilhões de habitantes do planeta não daria mais de 81 litros/ano para cada um deles. Esses dados demonstram a chance da cadeia produtiva do leite crescer, pelo potencial das áreas existentes e a capacidade de elevar a produtividade do rebanho leiteiro nacional que está muito abaixo comparada à de outros países (MDIC, 2006).

O Brasil, tradicionalmente, é um grande produtor de leite e aparece no cenário mundial como um dos países mais competitivos em custo de produção, cuja atividade começou com características extrativistas ocupando, atualmente, uma posição de destaque no cenário econômico nacional, transformando em um dos principais agronegócios do país (SIQUEIRA, 2010). O leite tem grande importância nutritiva e na economia, desempenha relevante papel social, principalmente na geração de empregos. A atividade leiteira no país é praticada em mais de um milhão e cem mil propriedades, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas. O Agronegócio do leite é responsável por 40% dos postos de trabalho no meio rural, este impacto supera setores tradicionalmente importantes como o automobilístico, a construção civil, siderúrgico e têxtil (VILELA et al., 2002).

Sob o ponto de vista quantitativo, considerando uma população de 185 milhões de habitantes, população aproximada encontrada no Brasil em 2010 (BRASIL, 2011), e a produção de 30.715.460 toneladas de leite para aquele ano, o volume produzido foi suficiente para que cada brasileiro tivesse disponível aproximadamente 166 litros por habitante ano, ou seja, aproximadamente 0,45 litros por dia. Para atender o consumo recomendado pelo Ministério da Saúde, que é 210 litros/habitantes/ano ou 0,575 litros dia, o volume total necessário naquele ano seria de cerca de 39 bilhões de litros, considerando a população brasileira de 185 milhões de pessoas (ALMEIDA, 2012).

A produção leiteira no Brasil vem apresentando aumento gradativo, de 2002 a 2012 a produção cresceu quase 50%. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), o Brasil no ano de 2012, produziu 32,3 bilhões de litros, 49,2% superior à produção de 2002 que foi 21,6 bilhões de litros. (Tabela 01). O Brasil aparece no cenário mundial como o quinto maior produtor de leite, sua produção aumenta a uma taxa anual de 4% superior a todos os outros países que ocupam os primeiros lugares, respondendo por 66% do volume total de leite produzido pelos países que compõem o Mercosul (SIQUEIRA, 2010).

Tabela 01 - Produção leiteira – Brasil – Evolução em 10 Anos

Ano	Produção (em mil litros)
2002	21.642.780
2003	22.253.863
2004	23.474.694
2005	24.620.859
2006	25.398.219
2007	26.137.266
2008	27.585.346
2009	29.085.495
2010	30.715.460
2011	32.096.214
2012	32.304.421
Varição 2002/2012	49,20%

Fonte: IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal

Avaliando o crescimento da produção de leite por período (Tabela 2), é possível visualizar que este vem se intensificando nos últimos anos. Enquanto no período de 1990 a 1995 o crescimento anual médio foi de 2,6%, entre 1995 e 2000 ele foi de 3,7% ao ano. Já de 2000 a 2005, cresceu 4,5% e, entre 2005 e 2010, 4,6% (REIS FILHO; SILVA, 2013).

Tabela 2 – Crescimento na produção de leite em diferentes períodos analisados

Período	Crescimento (%)	
	Período	Média anual
1990 – 1995	13,70	2,60
1995 – 2000	20,00	3,70
2000 – 2005	24,30	4,50
2005 – 2010	25,00	4,60

Fonte: IBGE, 2012.

O cenário da atividade leiteira brasileira mostra que o Sudeste e o Sul se destacam nesta atividade, estas regiões participaram com 69% dos 32,3 bilhões de litros de leite produzidos em 2012 no país, conforme dados do IBGE (Tabela 03).

A produtividade média da produção de leite no Brasil foi de 1.525 litros/vaca/ ano, em 2014, correspondendo a um crescimento de 2,2% em relação à observada em 2013 (1.492 litros/vaca/ano). A Região Sul apresentou a maior produtividade nacional, 2 789 litros/vaca/ano, um aumento de 4,3% em 2014, comparado ao ano anterior. As maiores produtividades ocorreram no Sul do País, destacando-se o Estado do Rio Grande do Sul com a maior produtividade nacional (3.034 litros/vaca/ano), seguido pelos Estados de Santa Catarina (2.694 litros/vaca/ano) e Paraná (2.629 litros/vaca/ ano). A menor produtividade foi encontrada no Estado de Roraima (345 litros/vaca/ano). Os Municípios de Araras (SP), Castro (PR) e Carlos Barbosa (RS) apresentaram as três maiores produtividades (IBGE,2014).

TABELA 03- Produção de origem animal - Ranking descendente
Leite - Produção de origem animal (Mil litros)

Ano 2012		
“ranking”	Grande Região	
1	Sudeste	11.591.140
2	Sul	10.735.645
3	Centro-Oeste	4.818.006
4	Nordeste	3.501.316
5	Norte	1.658.315

Fonte: IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal

A pecuária leiteira, na Região Norte e Nordeste, é composta basicamente por pequenos produtores. A produtividade de leite é baixa, por causa da incipiente capacidade de suporte das pastagens, rebanho não especializado e mercado inadequado ou em adequação (SANTANA; AMIN, 2002).

Em Alagoas a produção de leite é a segunda atividade econômica mais importante do Estado, perdendo apenas para a cana-de-açúcar, com sua bacia leiteira localizada no sertão e agreste alagoano (DANTAS, 2011).

A atividade leiteira na Região Nordeste é caracterizada pela diversidade do sistema de produção de leite, uma vez que são apresentados resultados técnicos e econômicos bastante diferenciados. Da mesma forma que acontece em praticamente todo o país, predomina a heterogeneidade dos sistemas de produção adotados pelos criadores, associado a pouca assistência técnica, qualidade do rebanho, efeitos climáticos e baixa qualidade nutricional dificultam o desenvolvimento da cadeia produtiva do leite nos Estados Nordestinos (REIS FILHO; SILVA, 2013).

Existem poucas publicações científicas tratando da importância do leite para o Estado de Alagoas, contudo, no Nordeste, em 2010, os Estados da Bahia, Pernambuco e Ceará lideram a lista dos maiores produtores, com aproximadamente 2,6 bilhões de litros por ano. Em Alagoas a produção de leite é oriunda, principalmente, da agricultura familiar e a produção está estimada em 231 milhões de litros por ano (VILELA, 2011).

No passado, Alagoas possuía a maior bacia leiteira do Nordeste. Atualmente, produz cerca de 600 mil litros de leite/dia, classificando em quarto lugar no “ranking” da produção nordestina, competindo com os estados de Pernambuco, Bahia e Ceará (NETO et al., 2000).

No estado de Alagoas existem 2 mil fornecedores de leite e um contingente de 300 mil habitantes existentes na bacia leiteira, gerando 25 mil empregos diretos e indiretos. A bacia leiteira alagoana conta com 17 municípios: Batalha, Belo Monte, Cacimbinhas, Dois Riachos, Estrela de Alagoas, Igaci, Jacaré dos Homens, Jaramataia, Major Izidoro, Minador do Negrão, Monteirópolis, Olha D`água das Flores, Olivença, Palmeira dos Índios, Pão de Açúcar, Santana do Ipanema e São José da Tapera (BNB, 2005).

O parque industrial instalado na Região Nordeste ainda é muito restrito. Isto se comprova pelo baixo percentual do leite que é produzido na região e que é captado e processado pelas indústrias, significando apenas 30,7% do total (IBGE, 2012). Em relação ao porte dos laticínios existentes na Região Nordeste, a grande maioria é de pequeno porte. De acordo com um levantamento realizado pela L&N Consultoria, em 2008, no Estado de Pernambuco, dos 106 laticínios existentes, 68,9% apresentavam capacidade de processamento instalada de até 5 mil litros/dia (CARVALHO, 2010). De um modo geral, o nível de industrialização nos estados da Região Nordeste é muito baixo. Destes, os mais críticos acontecem no Piauí e no Maranhão, onde o total do leite captado representa, respectivamente,

13,2% e 16,6% do total do leite produzido. O maior porcentual acontece nos estados do Ceará, com 48,6%, e Alagoas, com 43,9% (REIS FILHO; SILVA, 2013).

A qualidade do leite bovino é uma obrigação de quem produz e não apenas uma opção, pois o cidadão consumidor tem o direito de adquirir produtos confiáveis, tanto do ponto de vista sanitário quanto nutricional. A obtenção do leite de boa qualidade inicia-se com a ordenha de vacas sadias. Entre os procedimentos fundamentais a serem observados, destacam-se: a higienização no processo de obtenção do leite, o resfriamento do leite e o controle sanitário do rebanho (CANI; FRANGILO, 2008).

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza e sua importância é baseada em seu elevado valor nutritivo, com riqueza em proteínas, vitaminas, gorduras e sais minerais (TAMANINI et al., 2007), cálcio, altos teores de tiamina, niacina e magnésio, além da alta digestibilidade (GARCIA et al., 2000). Componente da dieta humana o leite pode ocasionar enfermidades, algumas delas conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's). As DTA's são consideradas um grande problema de saúde pública mundial. Enfermidades causadas por bactérias e algumas delas são zoonoses conhecidas, como a brucelose. Este quadro é agravado pela falta de conhecimento da maioria dos consumidores expondo-se ao perigo e a diversos agravos à saúde (WHO, 2001). No Brasil os dados a respeito das DTAs causadas pelo leite cru são inconsistentes e existe pouca informação disponível sobre a ocorrência de patógenos neste produto (NERO et al., 2003). Situação preocupante devido às deficiências dos serviços de vigilância epidemiológica e à falta de conscientização da população diante do problema (GERMANO; GERMANO, 2001).

3.2 O Mercado do Leite

No ano de 2004 o mundo produziu aproximadamente 516 bilhões de litros de leite sendo apenas 7% comercializados no mercado internacional. Este dado demonstra a importância do mercado doméstico de cada país para o mundo, comprovando a extrema importância que os produtores de leite têm em seus países (ZOOCAL; GOMES, 2006).

A globalização e a abertura de mercados influenciaram os setores produtivos mundiais a enfrentarem o desafio da competitividade. A pecuária leiteira no Brasil apresenta problemas de eficiência produtiva e qualidade da matéria prima que interferem na competitividade do produto brasileiro (RIBEIRO et. al., 2012). A baixa qualidade do leite nacional, evidenciada pela pequena produção animal/dia, falta de aptidão dos animais e custos não competitivos,

acabavam por excluir o setor leiteiro das exportações. Pelo contrário, o Brasil importava leite em pó para suprir o mercado interno (BELOTI et al., 2015).

Em um estudo onde foram avaliados dados de 574 produtores comerciais de leite provenientes de diversas regiões do estado de Minas Gerais, em um período compreendido entre os anos agrícolas de 1995/96 a 2001/02, concluíram que a baixa produtividade da pecuária leiteira em Minas Gerais e os elevados custos de produção evidenciam a necessidade de modernizar e profissionalizar a administração da propriedade com produção leiteira (FASSIO et. al., 2006). Como regra, pode-se afirmar que o caminho para viabilizar a atividade no campo é a qualidade gerencial. Com ele o empreendimento se profissionaliza, se moderniza e começa a ser encarado como empresa de fato, que busca obter conhecimentos do mercado em que opera (GODINHO, 2010).

A comercialização direta do leite cru é proibida por força de lei, mas em caráter precário e extraordinário pode ser autorizada desde que obedeça a critérios avaliados pelas autoridades locais (BRASIL, 1952). No entanto, a manutenção habitual deste comércio na zona urbana, abastecido por lojas varejistas de alimentos ou ambulantes, caracteriza o produto “leite cru” como informal. Os produtores rurais ou leiteiros, na qualidade de ambulantes, em geral são modestos, desorganizados e burlam ou desconhecem a lei para sobreviver. Comercializam o seu produto diretamente aos consumidores finais que em sua maioria desconhecem os riscos potenciais que podem ser veiculados e mantém este ciclo de comercialização informal (ABRAHÃO et al., 2005).

3.2.1 Comércio informal do leite

O mercado informal pode apresentar diversas formas de comercialização, envolve desde a venda de leite cru, *in natura*, em domicílios, a pequenas indústrias, padarias, sorveterias, dentre outras, além do comércio de derivados em domicílio, restaurantes ou comércio irregular (FONSECA; CARVALHO, 2004). Segundo Gerxhani (2004) o setor informal está quase sempre relacionado à atividade marginal ou residual, porém considerada como aspecto central da dinâmica econômica e social de qualquer país, em especial aqueles em desenvolvimento.

Segundo Belloti (2015) o leite informal é o produto vendido diretamente do produtor ao consumidor, sem garantia que tenha sido submetido a qualquer tratamento térmico ou que tenham sido obedecidas condições mínimas de higiene exigidas para captação, transporte e comercialização deste tipo de produto.

No caso do setor lácteo, assim como outros setores de alimentos, a necessidade de controle da informalidade deve ocorrer, devido a questões de segurança do alimento. Na cadeia produtiva do leite bovino no Brasil, deve-se ressaltar que apesar das recentes mudanças ocorridas (reestruturação industrial, aumento do consumo, aumento das exportações, mudanças nas exigências legais, etc.), os problemas da informalidade não foram solucionados. (FARINA et al., 2001).

A comercialização de produtos lácteos sem inspeção no Brasil atinge níveis extremamente elevados, independente da interpretação que se dê as estatísticas, tradicionalmente, considera-se que 45% do leite produzido que advém da produção é comercializado informalmente (FONSECA; CARVALHO, 2004).

De acordo com Olival e Spexoto (2004), na década de 1990 a cadeia produtiva do leite passou por processos de transformação, estruturais e operacionais, exigindo ajustes e adaptações para se chegar ao nível de qualidade, volume e regularidade que o varejo e os laticínios passaram a demandar. Com isto, muitos pequenos produtores impossibilitados de atender às exigências do mercado passaram a comercializar leite clandestinamente no Brasil, apesar da proibição no país desde 1952 com o RIISPOA (BRASIL, 1952). Estima-se que aproximadamente metade da produção nacional de leite seja comercializada informalmente (NERO et al., 2003), ou seja, sem inspeção sanitária e sem origem do produto. A manutenção da informalidade traz como consequências problemas de ordem econômica, sanitária e social, bem como, o consumo de produtos informais levam a inúmeros prejuízos à saúde da população (MILLER, 2008).

Em uma análise regional e avaliando os dados em dois diferentes períodos (1997-2004 e 2004-2011), é possível observar comportamentos diferentes no crescimento do volume de leite adquirido pelas indústrias nas respectivas regiões. No período de 1997 a 2004, a Região Norte foi a que apresentou o maior crescimento no volume de leite adquirido, passando de 329,6 para 831,3 milhões de litros, com crescimento de 152,2%. A Região Sul apresentou o segundo maior crescimento (48,1%), seguido da Região Sudeste (29,6%) e da Região Nordeste (26,8%). Neste período, a Região Centro-Oeste foi a que apresentou o menor crescimento apenas 19,2%. O aumento do volume de leite adquirido pelas indústrias cresceu acima do volume de leite produzido no país, resultando no aumento porcentual do leite processado com base na produção, reduzindo, portanto, o leite “informal” (REIS FILHO; SILVA, 2013).

O baixo nível de escolaridade e a idade do chefe de família (variáveis sociais), bem como a escala de produção, podem constituir-se em barreiras à entrada no mercado formal, ou

mesmo a substituição da atividade leiteira por outra qualquer. Entretanto, existem outras razões econômicas, tais como o preço obtido no mercado informal e falta de mecanismos institucionais que induzam a adequação ao mercado formal (BANKUTTI et al., 2008).

Ainda, é importante salientar que o empenho multisetorial do governo, indústria alimentícia, comércio e consumidor, são formas de fortalecer a prevenção e controle dos produtos informais (WHO, 2001).

3.2.2 Riscos decorrentes do consumo de leite informal

O controle das doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e os seres humanos assenta-se no emprego, racional e integrado, de recursos profiláticos dirigidos para os elos mais vulneráveis da cadeia de transmissão de tais patologias. Em algumas ocasiões, o leite comporta-se como importante substrato para veicular microrganismo patogênico de animais infectados aos seres humanos (VASCONCELLOS; ITO, 2011).

A produção de leite e o meio ambiente é uma via de mão dupla, a produção causa impacto ao meio ambiente e o ambiente representa uma fonte de contaminação ao leite. Os contaminantes podem ser definidos como qualquer substância ou organismo que intencionalmente ou não esteja presente no leite (BELOTI et al., 2015).

O leite é um produto muito perecível e por isso passível de contaminações por microrganismos, e quando obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes possui elevada contagem bacteriana total, constitui-se de um risco à saúde da população brasileira, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (NERO et al., 2003).

A presença de um microorganismo em um alimento depende da capacidade do microorganismo sobreviver nas condições oferecidas pelo alimento, tanto em sua composição nutricional, quanto a quantidade de água disponível, pH, temperatura e potencial de oxiredução. O leite apresenta alta atividade de água, pH próximo ao neutro, potencial de oxiredução positivo e portanto aeróbico, temperatura ambiente ou de refrigeração e contém nutrientes de todas as categorias, favorecendo a abrigar microrganismos de todos os gêneros ou espécies (BELOTI et al., 2015).

Algumas infecções como a brucelose e a tuberculose zoonótica são quadros sistêmicos relatados desde a descrição original como zoonoses clássicas transmitidas ao homem pelo leite e derivados, no entanto, a listeriose alimentar e uma manifestação de registro recente considerada, sob tal forma, como zoonose emergente (VASCONCELLOS; ITO, 2011).

São poucos os trabalhos com isolamento e identificação de vírus em alimentos. Entre os Enterovírus, cujo desenvolvimento se faz no trato gastrointestinal do homem e de animais, o de maior importância é o vírus da poliomielite, que já provocou surtos comprovadamente relacionados ao consumo de leite cru (QUEIROZ, 1994). Além de veicular uma série de patógenos zoonóticos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), tais como: *Brucella sp.*, *Coxiella burnetti*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes*, dentre outras (ABRAHÃO et al., 2005).

A febre Q é uma enfermidade difundida mundialmente, seu agente etiológico é a *Coxiella burnetii*, que pode ser transmitida pelo consumo de leite cru de animais infectados e provoca no homem o aparecimento de febre, calafrios, suor, dores na nuca e na cabeça (SANTOS et al., 2007).

O bacilo da tuberculose, quando encontrado no leite, normalmente é do tipo bovino (*Mycobacterium bovis*), o qual causa a tuberculose bovina, sendo altamente patogênica para o homem. As infecções tuberculosas nos seres humanos têm localizações variadas e normalmente são adquiridas através da ingestão de leite cru. Em crianças, provoca a escrofulose, que é a tuberculose dos gânglios cervicais. A tuberculose já é a principal causa de morte entre portadores do HIV (QUEIROZ, 1994).

O leite cru é o veículo de transmissão mais freqüente da Brucelose ao homem, sendo que seus derivados obtidos de matéria-prima não pasteurizada podem também transmitir a enfermidade. A *Brucella abortus* pode causar uma infecção conhecida como febre undulante, que em humanos não chega a ser fatal, mas pode causar prejuízos a saúde por períodos longos da vida da pessoa contaminada (BELOTI et al., 2015).

Leite, comercializado informalmente, consumido sem nenhum tratamento torna-se nestas condições como um dos principais responsáveis pela contaminação e transmissão de diversas doenças transmitidas por alimentos, tais como: intoxicações alimentares (*Staphylococcus aureus*), Brucelose (*Brucella abortus*), Clostridiose (*Clostridium perfringens*), febre tifoide e paratifoide (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella schottmuelleri* e *Salmonella hirshfeldii*), além de outras Salmoneloses (NERO et al., 2009). Muitas outras doenças podem ainda ser transmitidas pelo leite cru ou leite contaminado, tais como: cólera, difteria, leptospiroses, listerioses, pasteureloses, infecções por *Mycoplasma* e fungos patogênicos, dentre outros (QUEIROZ, 1994).

O controle higiênico-sanitário tem um papel fundamental, desde a obtenção de leite cru nas fazendas até a embalagem do produto final, pois a sua produção sob condições

inadequadas de higiene torna-o veículo de transmissão de doenças à população consumidora (CARDOSO; ARAÚJO, 2003).

3.2.3 Transmissão da *Brucella sp.* pelo leite

O alimento é a principal fonte de transmissão da brucelose para a população urbana, sobretudo pela ingestão de leite e derivados não pasteurizados. O leite contaminado é particularmente perigoso por ser consumido regularmente e em grande volume (OTA, 2013).

As bactérias da brucelose (*Brucella sp.*) são transmitidas para o homem através de contato direto com os animais ou quando há ingestão de leite não pasteurizado ou seus derivados, carne mal passada ou seus subprodutos. As bactérias da brucelose podem ser aspiradas ou penetrar no organismo através de feridas; quando ingeridas, invadem a mucosa intestinal. O período de incubação é de uma semana a um mês. É possível a transmissão direta da enfermidade da mãe para o feto (LAWINSKY et al., 2010).

Para a população que não mantém contato com animais a fonte em potencial de contaminação da brucelose é o leite não pasteurizado e seus derivados. A carne pode ser uma significativa fonte de infecção, especialmente em culturas onde há o hábito de consumi-la crua ou mal passada. O leite pode conter um grande número de *Brucella sp.* e representa um sério perigo pelo fato de serem consumidos em grandes quantidades ou na forma concentrada em queijos, cremes e outros derivados (WHO, 2006).

Em leite cru e queijo fresco a *Brucella sp.* pode permanecer viável por um período de até três meses, e no leite refrigerado tem a capacidade de resistência de 15 dias. (OTA, 2013). Na indústria, a pasteurização do leite, visa eliminar patógenos em potencial, prática fundamental para garantir a saúde dos consumidores e a qualidade do leite, possibilitando o controle da brucelose pela eliminação da *Brucella sp.* no leite (PAULA et al., 2015).

A pasteurização do leite levou a uma redução da transmissão da brucelose ao homem. Entretanto, a brucelose zoonótica também é considerada uma doença ocupacional que pode acometer assistentes agropecuários, médicos veterinários, zootecnistas, tratadores, vaqueiros, laboratoristas e magarefes. São trabalhadores cujo contato direto com descargas uterinas, produtos de aborto ou carcaças de animais doentes, além de acidentes de laboratório, aumentam o risco de infecção. O manuseio da vacina B19, que é patogênica para o homem, também põe em risco algumas classes de profissionais. Quanto à vacina RB51, não há informação suficiente para avaliar a sua patogenicidade para humanos, e não há descrição de

acidentes. É recomendável que se manuseie a vacina RB51 com os mesmos cuidados da estirpe B19 (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

3.3 Brucelose (*Brucella sp.*)

A brucelose é uma antropozoonose conhecida desde épocas remotas. Existem registros que Hipócrates, 460 A.C., fazia referência a pacientes com sintomas compatíveis a doença. Em estudos recentes realizados na Itália, em esqueletos remanescentes da catástrofe do vulcão Vesúvio na cidade de Herculano no ano de 79 da era cristã apresentavam lesões ósseas típicas de brucelose (POSTER, et al. 2009). A doença é uma zoonose quase sempre transmitida por contato direto ou indireto com animais infectados ou seus produtos. O possível risco para a saúde humana é subestimado, pois o problema é de difícil diagnóstico. A brucelose está presente na lista de enfermidades 2011 da Organização Mundial para Saúde Animal - OIE (OIE, 2011). Ela é classificada como doença transmissível considerada de importância socioeconômica e/ou para a saúde pública e com consequências no comércio internacional de animais e seus produtos (MONTEIRO, 2004).

O agente etiológico da brucelose é uma bactéria intracelular facultativa, pertencente ao gênero *Brucella*. Dentro deste gênero são descritas seis espécies independentes, cada uma com seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos) e *Brucella canis* (caes) (MERINO, 2004). Segundo Paulin e Ferreira Neto (2003), estas bactérias estão classificadas em dois grupos antigênicos distintos, as de morfologia colonial lisa ou clássica (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), que quando evoluem para formas rugosas ou mucoides deixam de ser patogênicas, e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*).

As bactérias do gênero *Brucella sp.* são cocobacilos não capsulados, parasitas intracelulares facultativos. O gênero *Brucella* é composto pela *B. abortus*, biótipos de 1 a 6 e 9; *B. melitensis*, biótipos 1 a 3; *B. suis*, biótipos 1 a 5; e *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, e, mais recentemente, *Brucella ceti* em golfinhos e baleias e *B. pinnipedialis* em focas e leões marinhos (LAWINSKY et al., 2010).

As infecções brucélicas nos animais domésticos estão associadas principalmente a problemas reprodutivos como abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade, com efeitos desastrosos para a pecuária. Assim, por causar prejuízo à pecuária e por ser transmitida dos animais para o homem, desde o início do século XX, muitos países têm

adotado medidas severas de controle ou erradicação da brucelose na população animal (POSTER, et al. 2009).

A brucelose constitui-se uma das doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais e o homem mais amplamente difundidas por todo o mundo (VASCONCELLOS, 1987). É uma doença que afeta a população humana em muitos países em desenvolvimento, incluindo os do Oriente Médio e América Latina onde ainda é endêmica (NIMRI, 2003), sendo que quatro espécies podem causar infecção em humanos: *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. suis* e especialmente *B. melitensis* (YOUNG, 1995). Esta última espécie causa a mais importante doença brucélica clinicamente aparente, porém, não está presente no Brasil (POESTER, 2002). As brucelas são capazes de causar cronicidade devido a sua capacidade de bloquear os mecanismos de defesa do hospedeiro por sobreviver intracelularmente (NIMRI, 2003). De acordo com Paulin e Ferreira Neto (2003) as *Brucella sp.* são parasitas intracelulares facultativos capazes de se multiplicar e sobreviver dentro de macrófagos, devido a sua habilidade em escapar da resposta imune do hospedeiro. Um dos possíveis mecanismos de escape seria a capacidade que esta bactéria tem de produzir adenina e guanina monofosfato, que inibiriam o processo de fusão fago lisossômica.

A Food and Agriculture Organization (FAO), Corbel (2006) e World Organization for Animal Health (OIE) considera a Brucelose como uma das zoonoses mais importantes e disseminadas no mundo.

As implicações da Brucelose geram barreiras econômicas internacionais ao comércio de produtos de origem animal e perdas na indústria com a condenação de leite e carne, queda nos preços da carne leite e derivados, desvalorização para o mercado externo, e altos custos com programas de controle, erradicação e pesquisas (JARDIM et al., 2006).

3.3.1 Brucelose (*Brucella sp.*) em seres humanos

A brucelose constitui-se uma das doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais e o homem mais amplamente difundidas por todo o mundo (VASCONCELLOS, 1987). O primeiro caso de brucelose humana relatado no Brasil ocorreu em 1913. Entre 1930 e 1950, um grande número de publicações descreveu a doença em diversos estados do Brasil sendo que a maioria dos casos foi essencialmente uma fatalidade ocupacional, ocorrendo primariamente entre trabalhadores de abatedouros e processadores de carne (POESTER, 2002).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), julga-se que, mesmo nos países desenvolvidos, a verdadeira incidência da brucelose pode ser cinco ou mais vezes superior à que os números oficiais sugerem. Este fato é atribuído à sub diagnóstico e à sub declaração "obrigatória". A estrutura para o diagnóstico da brucelose no Brasil ainda é incipiente, sendo importante e pertinente sua implantação e implementação (LAWINSKY et al., 2010). A conscientização sobre a importância da adoção de medidas profiláticas em todas as etapas da cadeia alimentar, implementação de programas sanitários e medidas educativas da produção ao consumidor possibilitara a redução dos casos de zoonoses transmitidas pelo leite e derivados (VASCONCELLOS; ITO, 2011).

Cerca de 60% dos casos apresentam complicações osteoarticulares, sendo a mais comum a sacroilite. Observam-se também infecções geniturinárias entre 2 a 20% dos casos, sendo a orquite e a epididimite as mais comuns. A taxa de letalidade da brucelose sem tratamento é de 2% ou menos, e é normalmente consequência da endocardite secundária à infecção por *Brucella melitensis* (PESSEGUEIRO et al. 2003).

A brucelose é usualmente transmitida para os humanos pela ingestão de produtos lácteos não pasteurizados ou pelo contato direto com animais infectados. A doença ocupacional é contraída pela exposição de trabalhadores de abatedouros e veterinários aos animais infectados, especialmente fetos abortados, fluídos, membranas ou urina (NIMRI, 2003).

De acordo com Castro e Gabriel (2009) o consumidor pode contrair a brucelose, através da ingestão de leite cru e derivados, preparados com leite que não foi submetido ao tratamento térmico, onde a bactéria pode persistir durante vários meses. Em diversas regiões do Brasil é comum as pessoas consumirem produtos de origem animal, que não sofreram inspeção pelos órgãos e profissionais competentes. O comércio clandestino destes produtos constitui ameaça à saúde pública (BRASIL, 2010)

Compondo o grupo das zoonoses, doenças transmitidas dos animais ao homem, a brucelose é causada por uma bactéria, que pode alojar-se dentro das células de defesa, o que dificulta seu controle. Devido à inespecificidade de sintomas, torna-se difícil o diagnóstico no homem, sendo conhecida como "Doença das mil faces". Na fase inicial, o indivíduo enfermo pode apresentar sintomas como fraqueza, mal-estar, dores musculares e articulares, cefaléia e febre intermitente. O quadro pode evoluir e, geralmente, o tratamento é prolongado (CASTRO; GABRIEL, 2009).

A ameaça à saúde humana causada por *Brucella abortus*, assim como por outras espécies de *Brucella*, não tem sido estimada, considerando-se a falta de relatos e de serviços

diagnósticos para brucelose humana (POESTER, 2002). Embora a brucelose seja uma doença de notificação obrigatória, em muitos países, os dados oficiais não refletem totalmente o número de casos anuais, sendo a incidência verdadeira estimada entre 10 e 25 vezes maior do que os relatos indicam. O diagnóstico da brucelose humana baseado apenas no quadro clínico não é definitivo já que os sintomas mimetizam outras doenças e são inespecíficos. O isolamento do organismo em cultivo ou detecção por métodos moleculares é necessário para confirmar o diagnóstico clínico (NIMRI, 2003).

A adoção de medidas de proteção nas diferentes atividades profissionais como a proteção individual ao manipular fetos ou produtos de abortos (POESTER, 2009). Numa exploração animal, as pessoas devem utilizar equipamentos de proteção individual - EPIs (luvas, óculos, máscaras e botas), fazer a eliminação (abate sanitário) dos animais excretadores (doentes), assim como dos produtos excretados de animais doentes (sangue, vísceras, abortos, carcaças), além de cuidados no momento da imunização dos animais (NOCITI et al., 2008). Nos laboratórios deve-se atentar para o atendimento aos quesitos de biossegurança e boas práticas laboratoriais (BRASIL, 2010).

Em geral, a transmissão da infecção animal é potencializada para as pessoas em decorrência da inobservância de normas adequadas no manejo sanitário das criações e de práticas insalubres das pessoas na lida sistemática com o gado bovino. A maior dificuldade de identificar e caracterizar a dinâmica da infecção em humanos é a inexistência de uma técnica específica para esse fim, sendo, por isso, utilizados nos ensaios sorológicos envolvendo pessoas, os mesmos testes de referência empregados para o diagnóstico da brucelose bovina, contidos no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT, implementado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2004).

No homem, os sintomas mais comuns são aqueles observados na fase de bacteremia, nos quadros de infecção generalizada, tais como: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios e suores noturnos profusos com um odor particular. A sintomatologia da brucelose aguda consiste em astenia, fadiga, constipação, anorexia, cefaleia, artralgia e um forte impacto no sistema nervoso levando a neurastenia, depressão, impotência sexual e insônia. Com o agravamento do quadro surgem artrites, espondilites, bursites, dores reumáticas e neuralgia lombar, inflamação na medula óssea e em muitos órgãos onde a bactéria consegue se alojar, principalmente fígado, baço e linfonodos. A possibilidade de mulheres abortarem devido à infecção não é afastada, porém é rara. A maioria dos pacientes recupera-se em um a dois anos, com ou sem tratamento. Os sintomas da forma crônica são

causados pela hipersensibilidade as proteínas da bactéria. O diagnóstico clínico da brucelose humana é difícil, pois os sintomas são inespecíficos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A doença afeta vários sistemas nos seres humanos, produzindo grande variedade de sintomas, porém também é possível a forma assintomática. Clinicamente, a brucelose humana se manifesta por febre aguda, acompanhada de mal estar, anorexia e prostração, podendo persistir e progredir para a cronicidade, com severas complicações osteomusculares, neurológicas e cardíacas (PAULA, et al., 2015).

3.3.2 Brucelose (*Brucella sp.*) em bovinos

A brucelose bovina é uma doença infecto-contagiosa produzida por *Brucella abortus*, caracterizada pelo aborto de fêmeas em estados avançados de gravidez. Os microrganismos são eliminados no leite e secreções uterinas e podem entrar no organismo pelas membranas mucosas, conjuntivas e ferimentos. (NASCIMENTO et al., 2005). A contaminação ocorre em bovinos, no homem (zoonose), suínos, equinos, caprinos, ovinos e cães. Sendo uma zoonose de distribuição mundial, conforme mostra a Figura 01, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. (OTA, 2013)

O diagnóstico presuntivo baseia-se nos sinais clínicos, mas o definitivo sempre será sorológico ou bacteriológico. Não há tratamento, mas recomenda-se o sacrifício dos animais reagentes positivos. Medidas sanitárias preventivas como a vacinação de bezerras contra a brucelose e o controle do trânsito de animais destinados à reprodução devem ser adotadas (NASCIMENTO et al., 2005).

A *B. abortus* é o agente etiológico da brucelose bovina, mas os bovinos são susceptíveis à infecção por outras espécies da bactéria. Em Israel foi relatado um episódio de brucelose bovina causada por *B. melitensis*, no qual a transmissão da bactéria ocorreu por soro de leite caprino que não foi adequadamente pasteurizado e utilizado na alimentação bovina (KIMBERLIG, 1994).

Nos animais, predominam clinicamente os abortos e retenções placentárias (BEER, 1999). O prejuízo econômico causado origina-se da infertilidade de machos e fêmeas causada pela doença, fazendo com que a produção de carne e leite diminua drasticamente (EMBRAPA, 2000).

Machos e fêmeas bovinos são suscetíveis à doença, porém as fêmeas adultas, eliminam grande quantidade de *Brucella abortus* para o ambiente no momento do parto ou aborto e também durante todo o puerpério, são as principais responsáveis pela propagação da

infecção entre os animais. Essas fêmeas permanecem cronicamente infectadas devido à permanência de brucelas nos tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A transmissão natural ocorre através da ingestão de microrganismos, que se encontram presentes em um grande número de fetos abortados, membranas fetais e secreções uterinas. Os bovinos podem ingerir alimentos e água contaminados, ou ter contato com os genitais contaminados de outros animais. A transmissão venérea de touros infectados para vacas suscetíveis parece ser rara. A transmissão pode ocorrer por inseminação artificial, quando se deposita sêmen contaminado com *B. abortus* no útero, mas esta não ocorre, notadamente, quando esse sêmen é depositado na cérvix média (BLOO; RADOSTITS, 1991). Os microrganismos podem entrar no organismo pelas membranas mucosas, conjuntivas e ferimentos (MANUAL MERCK, 2001). A partir do quinto mês de gestação, o aumento crescente da concentração de eritritol e a presença dos hormônios sexuais estimulam a multiplicação bacteriana. A ocorrência de placentite necrótica dos cotiledones compromete a circulação materno-fetal, prejudicando a respiração e alimentação fetais, podendo leva-lo a morte e por consequência ao aborto (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). O eritritol é um álcool poli hídrico considerado o fator de crescimento para as Brucelas e se encontra nas placentas dos ruminantes (BASTOS et al., 2012)

Os achados clínicos dependem do perfil imunológico do rebanho. Em um rebanho de vacas prenhes, não vacinadas e altamente suscetíveis, a característica principal da doença é o aborto após o quinto mês de gestação; onde a retenção de placenta e a metrite são as sequelas comuns. As infecções mistas costumam ser a causa de metrites, que podem ser agudas, com septicemia seguida de morte, ou crônicas, levando à esterilidade. Nos touros, a orquite e a epididimite ocorrem ocasionalmente (BEER et al., 1999). O diagnóstico presuntivo baseia-se fundamentalmente nos sinais clínicos, entretanto, o diagnóstico definitivo sempre será sorológico ou bacteriológico, tendo em vista as numerosas causas de aborto e à similaridade dos sinais em outras enfermidades (MATHIAS et al., 2001).

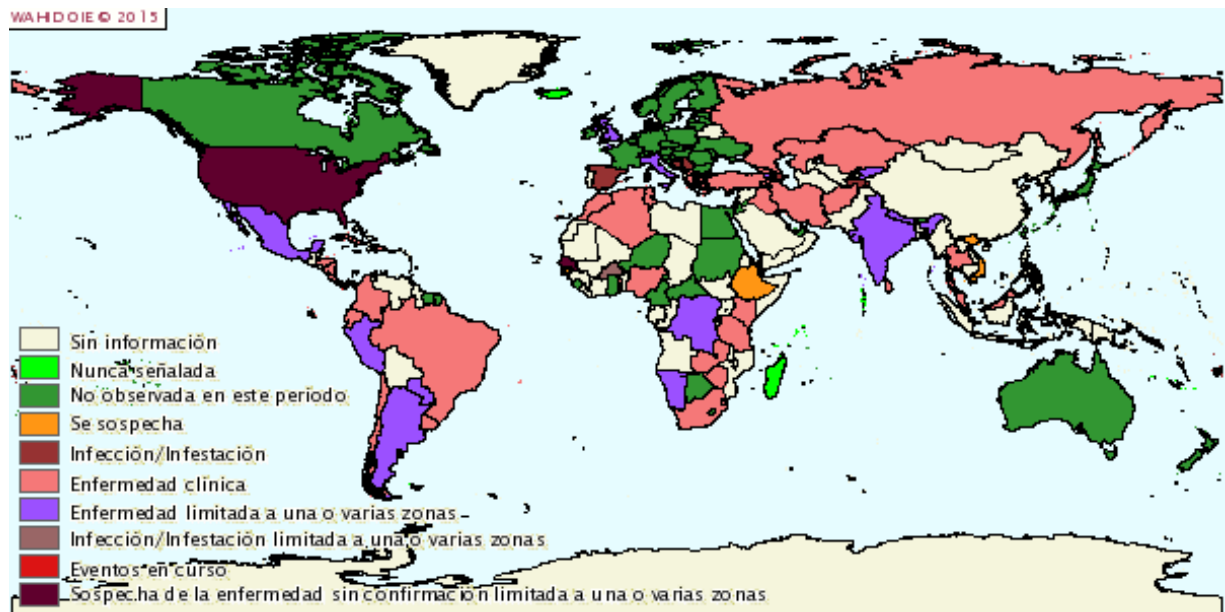
A predileção para útero gravídico se deve à produção, pelo mesmo, do hormônio chamado eritritol. O eritritol atrai as brucelas e funciona como fator estimulante para o seu crescimento. Este hormônio só está presente em bovinos, caprinos, ovinos, suínos e cães, e está relacionado com a ocorrência do abortamento. Este hormônio não é produzido pela mulher ou pela égua que, por conseguinte, não apresentam abortamento em consequência da brucelose (BASTOS et al., 2012).

A enfermidade ocorre de preferência em bovinos sexualmente maduros. Porém bezerras nascidas de mães reagentes é, na maioria das vezes, sorologicamente positivas de quatro a seis meses, devido aos anticorpos presentes no colostro, mais tarde tornando-se negativas, mesmo que a infecção, em estado latente, esteja presente em uma pequena proporção desses animais. Bezerras que sofrem a infecção in útero podem permanecer no estado de infecção latente, com a *Brucella* persistindo em seus pulmões e linfonodos regionais, apresentando-se sorologicamente negativas, ou com títulos sorológicos instáveis, até o primeiro parto, sendo convertendo-se a partir da metade de sua primeira gestação, podendo, inclusive, eliminar o agente etiológico. Essas infecções latentes nos animais sorologicamente negativos tem grande importância porque passam despercebidas e podem servir como fonte de infecção algum tempo depois. Nesses casos a vacinação é ineficaz (BRASIL, 2006).

A brucelose, doença infecto-contagiosa, que, apesar dos esforços voltados para o seu controle, ainda constitui um problema econômico e sanitário dos mais sérios para os rebanhos bovinos de diversos países, entre os quais o Brasil (MATHIAS et al., 2001). As perdas devidas à brucelose bovina no Brasil foram estimadas em R\$ 420,12 ou R\$ 226,47 para cada fêmea infectada acima de 24 meses de idade em rebanhos de leite ou corte, respectivamente. O prejuízo total estimado foi de, aproximadamente, R\$ 892 milhões (equivalentes a \$ 448 milhões de dólares americanos). A cada 1% de variação na prevalência, estima-se a variação de 155 milhões de reais no custo da brucelose bovina no Brasil (SANTOS, et al., 2013).

No Brasil, não existem estudos concretos sobre os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina. As perdas diretas são decorrentes dos abortos e período de esterilidade temporária, responsáveis pelas quedas nas taxas de natalidade, aumento do intervalo entre partos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa da produção de leite (CAMPANA et al, 2002). Segundo Santos et al.(2013), no Brasil a brucelose bovina gera perdas econômicas ao agronegócio na ordem de \$ 448 milhões de Dólares Americanos, com impacto direto na produção de carne ou leite bovino, além de ser uma forte barreira sanitária nas transações do comércio internacional.

Figura 01 – Distribuição da Brucelose em animais no mundo.



Fonte: OIE (2015).

O último diagnóstico de situação da brucelose bovina nacional foi realizado em 1975, tendo sido estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na Região Nordeste e 4,1% na Região Norte. Posteriormente, outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns Estados, revelaram pequenas alterações na prevalência de brucelose: no Rio Grande do Sul, a prevalência passou de 2,0% em 1975, para 0,3% em 1986, após uma campanha de vacinação bem sucedida; em Santa Catarina, passou de 0,2% em 1975, para 0,6% em 1996; no Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, idêntica ao valor encontrado em 1975 para o território mato-grossense; em Minas Gerais, passou de 7,6% em 1975, para 6,7% em 1980; no Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% de bovinos soropositivos em 1989. Os dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998 (BRASIL, 2006).

A brucelose bovina é uma doença endêmica no Brasil, tendo sido diagnosticada em todos os estados da Federação; contudo existem marcadas diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os estados (LAGE, 2008). Segundo o Ministério da Agricultura, (BRASIL, 2006) está disseminada por todo o território nacional atingindo tanto o gado de corte quanto o gado de leite se estendendo também ao rebanho bubalino. Na região nordeste,

constatou-se positividade à brucelose em bovinos de vários rebanhos dos diversos Estados, inclusive Alagoas (NUNES, 2001).

A detecção da brucelose nos animais é uma ferramenta essencial para a prevenção da doença em humanos. Prevenir é tão importante quanto o diagnóstico precoce para a redução da morbidade da brucelose. Uma melhor atuação da fiscalização sanitária, dos serviços de defesa agropecuária, melhorando a eficiência da notificação da doença, além de programas educacionais é essencial ao controle da enfermidade em seres humanos (NOCITI et al., 2008).

No Brasil, são poucos os estudos com grande abrangência sobre a situação da brucelose bovina. O último estudo nacional envolveu 19 estados e foi realizado em 1975 (Brasil, 1977). Posteriormente, apenas cinco estados realizaram trabalhos que envolveram todo o seu território, com uso de diferentes metodologias, sendo assim a situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil não é adequadamente conhecida (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

3.4 Reação em Cadeia Polimerase

O processo da PCR foi descrito por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica), Em 1989, a Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation patenteou este processo. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, que é a identificação de "impressões digitais" genéticas, a construção de árvores filogenéticas (árvores de relação entre espécies), a clonagem de genes, testes de paternidade, exames para detecção de agentes patogênicos e etc. (MULLIS et al., 1997). As técnicas moleculares têm sido utilizadas com frequência na identificação e caracterização de bactérias. Dentre as técnicas utilizadas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem se destacando na área da microbiologia para detecção de micro-organismos em amostras de leite e outros alimentos (AHMADI et al., 2010).

A PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA. Uma das principais aplicações da PCR é na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime, como: pedaços de cabelo que contenham bulbo, gotas de sangue ou saliva, pedaços de pêlo ou até mesmo a minúscula quantidade de DNA deixada em uma impressão digital (SAIKI et al., 1998). A PCR também é utilizada na paleontologia para o sequenciamento gênico de animais pré-históricos. Também é muito utilizada na identificação

de microrganismos, tendo em vista que apenas 1% dos microrganismos são cultiváveis e podendo ser isolados. A PCR é o primeiro passo para o posterior sequenciamento. Após obter as sequências geradas pelos equipamentos podem-se consultar bases de dados na internet para tentar localizar suas possíveis origens, sendo bactérias, archeas ou etc. (VERKUIL, 2008).

A técnica de PCR envolve três etapas básicas por ciclo, estimuladas pelo calor, que são repetidas por várias vezes, em ciclos: Abertura da fita de DNA que servirá de molde, por desnaturação térmica (etapa com duração entre 30s e 1min a temperatura de 92-96°C); Pareamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde, à região complementar da fita que sofrerá a duplicação (duração de 30s a 1 min a temperatura entre 58 e 65°C); Polimerização, através de uma enzima polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP como substrato da reação de polimerização (duração entre 45s e 1min, a 72°C). Cada ciclo é repetido em torno de 60 vezes, e promove a amplificação da região alvo determinada conforme afinidade das sequências iniciadoras (primers). Assim, o iniciador reconhece, por complementaridade, o local de início do local a ser amplificado, efetua a ligação e sinaliza para a polimerase o início da sequência a ser replicada. O grande problema inicial foi à desnaturação seguida da enzima polimerase, que, obtida de *Escherichia coli*, não suportava a temperatura para abertura das fitas de ácidos nucleicos. Assim, a cada ciclo, uma nova quantidade de enzima deveria ser adicionada (COSTA, 2009).

A maior vantagem desse método é possuir alta sensibilidade e precisão, mesmo quando são testadas amostras com baixa concentração de micro-organismos (SANTILIANO et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R.M.C.M. *et al.* 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.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales: Bacteriosis e Micosis**. 3. ed. Washington: OPS, 2001. (Publicación científica y técnica, v. 3, n.580) 398p.
- AHAMADI, M.; ROHANI, S.M.R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Com. Clin. Pathol.**, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010.
- ALMEIDA, E. S. **Diagnóstico da pecuária leiteira dos municípios de Batalha, Major Izidoro e Craíbas do Estado de Alagoas**. Dissertação (Mestrado em Produção de Ruminantes). Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo-AL, 2012.
- BNB. Perfil dos Estados – Alagoas: **Polo de Desenvolvimento Integrado – Bacia Leiteira de Alagoas**. 2005.
- BANDINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A. Hábitos dos consumidores de leite cru, produzido e comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu/ SP e de São Manuel/SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 51. 1997.
- BÁNKUTI, F.I.; SCHIAVI, S. M. A.; FILHO, H. M. S. Mensuração e análise de custos de transação arcados por produtores de leite nos mercados formal e informal da região de São Carlos/SP. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v.10, n.3, p. 343-358, 2008.
- BASTOS, R.; SOARES, C. O.; ELISEI,C.; MUNHOZ, A. L. R.; BEZERRA, N. L.; CAITANO, M. A. B.; ROSINHA, G. M. S. Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 32, p 957-962. Outubro, 2012.

BEER, J.. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, 1999.

BELOTI, V. **Leite clandestino: quem tem medo do lobo mau?**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mn/>>, 2001. Acesso em: 15 de abril de 2015.

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S.; SILVA, L. C. C.; FAGNANI, R.; REIS, K.T.M.G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.

BLOOD, D.C.; RADOSTISTIS, O.M. **Clínica Veterinária**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 570-80, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **RIISPOA**. Decreto 30.691 de 29 de março de 1952 e alterado pelo Decreto 1.25 de 25 de junho de 1962. Rio de Janeiro. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Diagnóstico de saúde animal**, Brasília, 1977. 735p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: Departamento de Defesa Animal, 2004. 132p..

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n°62 de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da União, Brasília:

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448p.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leite comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114-115, p. 34-40, 2003.

CARVALHO, G. R. **A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro.** *Circular Técnica 102*. Juiz de Fora: Embrapa Leite, 2010.

CASTRO, K. N. C.; GABRIEL, A.M.A. **Porque preocupar-se com a brucelose bovina?** Artigo em Hypertexto. Disponível em:
<http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Brucelose/index.htm>. Acesso em: 20/4/2015.

CAMPAÑA, R. C.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUCA, M. M. **Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina.** 2002. Disponível em:
http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm. Acesso em: 07 maio 2015.

CANI, P. C.; FRANGILO, R. F. **Como produzir leite de qualidade.** Vitória, ES: ACPLES - Associação de criadores e produtores de gado de leite do Espírito Santo, 2008. 40p.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infect.**, v.45, p.122-127, 2002.

CORBEL, M. J. **Brucellosis in humans and animals.** Geneva: World Health Organization, 2006. 102p.

COSTA, R. J. **Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).** Artigo por Colunista Portal - Educação - terça-feira, 18 de agosto de 2009 Disponível em
<http://www.portalfarmacia.com.br/farmacia/cursos/cursos_detalhes.asp?id=80>. Acesso em: 17 abril 2015.

DANTAS, J. S. **Palestra de abertura**. CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 10. 2011, Maceió: Centro de Convenções, 26 out. 2011.

EMBRAPA. Gado de Leite, **Panorama do Leite – ano 6**, nº 75 (abr/2012). Juiz de Fora, 2012.

EMBRAPA. Acre, **Instruções Técnicas: Brucelose, diagnóstico e controle**. Rio Branco, 2000. 3 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15 de abril de 2015.

FARINA, E. M. M. Q.; JANK, M. S.; Galan, V. B.; NASSAR, A. M.; RIBEIRO, F. A. F. Leite Clandestino: um problema real! **Boletim do Leite**. CEPEA/FEALQ/USP. Piracicaba. Ano 7, número 81. Dezembro de 2001.

FASSIO, L. H.; REIS, R. P.; GERALDO, L. G. Desempenho técnico e econômico da atividade leiteira em Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec., Lavras**, v.30, n.6, p. 1154-1161, nov./dez., 2006.

FDA (Food and Drug Administration). Bad bug book. Handbook of Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Food and Drug Administration, 2nd ed. (2012).

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2015.

FONSECA, L. F. L.; CARVALHO, M. P. **Leite Políticas e Derivados**. Ed. Quiron Comunicação e Conteúdo, p. 74-77, 158, 2004.

GARCIA, C. A.; Silva, N. R.; LUQUETTI, B.C.; SILVA, R. T.; MARTINS, I. P.; VIEIRA, R. C. **Influência do ozônio sobre a microbiota do leite ‘in natura’**. São Paulo. Revista Higiene Alimentar, v.14, n. 70, p.36-50, 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GERXHANI, K. **The Informal Sector in Developed and Less Developed Countries: A literature Survey**. Tinbergen Institute Discussion Paper. Amsterdam Institute for Advanced Labor Studies (AIAS) / Amsterdam School for Social Science Research (ASSR) - University of Amsterdam. Amsterdam, 2004.

GODINHO, R. F. **Gestão Empresarial em Sistemas de Produção de Leite na Microregião de São João Batista do Glória/MG**. Dissertação de Mestrado – UNICASTELO. Descalvado – SP. 112p. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE)

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default_zip_municipios_xls.shtm Acessado em 19/04/2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE)

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default_zip_municipios_xls.shtm Acessado em 19/04/2015.

JARDIM, G. C.; PIRES P. P.; MATHIAS L. A.; RIBEIRO O. C.; KUCHEBUK M. R. G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 3: p.177-182, 2006.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO. T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. X.; Brucelose bovina: uma atualização. **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008.

LAWIINSKY, M. L. J.; OHARA, P. M.; ELKHOURY, M. R.; FARIA, N. C.;

CAVALCANTE, K. R. L. J. Estado da arte da brucelose em humanos. **Rev Pan-Amaz Saude**. v.1, n. 4: p.75-84, 2010.

KIMBERLING, C.V.; MARSH, D., **Ram breeding soundness evaluation**. Proc. Small Ruminat Short Course, Am. Coll. Theriogenologists and Society for Therogenology, Hastings, NE USA, p. 55-71. 1994.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; VALÉRIO, W. N. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.21, n. 4, p.139-142, 2001.

MERINO, A.L. *Brucella*. 2004. Disponível em:
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap7/>. Acesso em 06 maio 2015.

MILLER , N.B. **Perfil do consumo de leite e derivados lácteos no município de Calotina-ES**. Vitória, 2008. 83f. Especialização (Lato Sensu)-Instituto Brasileiro de pós-graduação Qualittas.Universidade Castelo Branco, 2008.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. (MDIC)/GTP APL. **Manual de Apoio aos Arranjos Produtivos Locais**. Brasília: MDIC, 2006.

MONTEIRO, L. A. R. C. **Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul**. 2004. 64 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul Campo Grande, 2004.

MULLIES, et al. **System for automated performance of the polymerase chain reaction**, United States Patent, Patente Número - [US 5656493](#), August 12, 1997.

NASCIMENTO, M. V.; SILVA R. D.; ARAÚJO, P. P.; OLIVEIRA, L. R.; FERREIRA W.; MOTERANI, L. G.; MARTINS L. A. Aspectos Epidemiológicos da *Brucella abortus*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – Edição 4 – Janeiro/2005 - ISSN 1679-7353

- NERO, L. A.; MAZIE, D.; BEZZERA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p.21-26, 2003.
- NETO, A.P., MARQUES, R. L. M., FRANÇA, F. M. C. **Documento Referencial do Polo de Desenvolvimento Integrado Bacia Leiteira de Alagoas**. Fortaleza: Banco do Nordeste; 2000.
- NIMRI, L. F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, v.3, n.5, 2003.
- NOTICI, R. P.; NOTICI, D. L. P; SILVA, G. C. P.; AVILA, M. O. **Fatores de risco associados à brucelose em médicos veterinários com predisposição ocupacional em Mato Grosso, Brasil**. In: CONBRAVET, 35., 2008, Gramado. Anais 35° Conbravet. Gramado: Sovergs, 2008. p. 630 - 636. Disponível em:
<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anasi/cd/resumos/R360-1.pdf> Acesso em: 15 de abril de 2015.
- NUNES, A. C. B. T. **Prevalência da Brucelose Bovina em Rebanhos Leiteiros da Microrregião de Batalha – AL**. 2001, 37f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2001.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL PARA SAÚDE ANIMAL - OIE. Enfermedades de la Lista de la OIE. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2013/>>. Acesso em: 17 de abril de 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL PARA SAÚDE ANIMAL - OIE. Enfermedades de la Lista de la OIE. Mapas de distribución de las enfermedades Disponível em:
<<http://www.oie.int/wahis2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang> Acesso em: 17 de abril de 2015.
- OLIVAL, A. A.; SPEXOTO, A. A. Leite informal no Brasil: aspectos sanitários e educativos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, p. 12-17, 2004.

OTA, E. T. S. **Detecção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.** Dissertação (Mestrado em ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2013.

PAULA, C. L.; MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C. M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF, S. D.; MEDIJ, J. Detecção de *Brucella sp.* em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arq. Int. Biol.** São Paulo, v 82 1-5, 2015.

PAULIN L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina. Situação brasileira.** Jaboticabal: Funep. 154p. 2003.

PESSEGUEIRO P., BARATA C., CORREIA J. **Brucelose: uma revisão sistematizada.** Med Interna. 2003;10(2):91-100.

POESTER, F. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MULLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v.61, supl. 1, p.1-5, 2009

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology,** v.90, p.55- 62, 2002

POESTER, F. P. **Manual de Zoonoses: Brucelose.** Curitiba: CRMV(PR, SC, RS), 2009.

QUEIROZ, J. C. **Avaliação Sanitária do Leite Cru distribuído nos Municípios de Juquitiba e Itapecirica da Serra** [dissertação de doutorado apresentada ao Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP], 1994

REIS FILHO, R. J. C.; SILVA, R. G. **Cenários para o leite e derivados na Região Nordeste em 2020.** Recife: Sebrae, 2013.154 p.

RIBEIRO NETO, A. C.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÉ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.

SAIKI, R. K., et al. **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase**. *Science* 239 (1998): 487-491.

SANTANA A. C.; AMIN, M. M. **Cadeias produtivas e oportunidades de negócios na Amazônia**. Belém (PA): UNAMA, 2002.

SANTILIANO, F. C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 1327-1342, 2011.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; FRANÇA, A. Febre Q: revisão de conceitos. **Medicina Interna Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna** Vol.14, nº 2, abr/jun 2007.

SANTOS, R. L.; MARTINS T. M.; BORGES, Á. M.; TATIANE A. PAIXÃO, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.6, n. 33, p. 759-764, jun. 2013.

SIQUEIRA, K. B., et al. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica 104**. Juiz de Fora, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, 2010 12p. ISSN 1678-07X

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Ver. Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p.449-454, jul.set, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Foodborne Disease: A Focus for Health Education. World Health Organization, Geneva, 2001, 198 pp, ISBN 92-4-156196-3

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal **Comunicado Científico da Fac. Méd. Vet. Zootec.** Univ. S. Paulo, v.11, n.1, p. 25-36, 1987

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F. H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite – Atualização / Major milk transmitted zoonoses – Update / **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Continuous Education Journal in Veterinary Medicine and Zootecny of CRMV-SP.** São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 1, p. 32–37, 2011.

VERKUIL, E. P.; BELKMU, A.; HAYS, J.P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification** , Springer Science & Business Media, 2008

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias.** 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p.421.

VILELA, D. **Palestra de abertura.** CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 10. 2011, Maceió: Centro de Convenções, 26 out. 2011.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. **Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro.** Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

YANG, S.; ROTHMAN, R. **PCR-based diagnostics for infections diseases: uses limitations, and future applications in acute-care settings.** The Lancet. Infections diseases, v.4, p.337-348, 2004.

YOUNG, E.H. An overview of human brucellosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, p.283-290, 1995.

ZOCCAL, R.; GOMES, A.T. **Zoneamento da produção de leite no Brasil. Sistemas Agroalimentares e Cadeias Agroindustriais no Brasil.** Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2006.

4 ARTIGO

Detecção molecular de *Brucella sp.* em leite “informal” comercializado nos municípios de Alagoas, Região Nordeste do Brasil.

4.1 Introdução

O leite informal é o produto vendido diretamente do produtor ao consumidor, sem garantia que tenha sido submetido a qualquer tratamento térmico ou que tenham sido obedecidas condições mínimas de higiene exigidas para captação, transporte e comercialização deste tipo de produto (BELLOTI, 2001).

O alimento leite comporta-se como importante substrato para veicular microrganismo patogênico de animais infectados aos seres humanos. Infecções como a brucelose apresentam quadros sistêmicos descritos como zoonoses clássicas transmitidas ao homem pelo leite e derivados (REIS FILHO; SILVA, 2013).

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*. A importância da brucelose animal varia de um país para o outro, dependendo da população animal exposta, da espécie de *Brucella* envolvida e das medidas tomadas para combatê-la (CORREA, 2007).

Nos anos de 2001 a 2004, foi realizado estudo de caracterização epidemiológica da brucelose nos estados da Bahia, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Sergipe, Tocantins e no Distrito Federal. No estado do Mato Grosso os trabalhos de campo já haviam sido realizados em 1998. Os resultados do estudo foram publicados no final de 2009 e mostraram que a doença está distribuída em todo o território nacional (BRASIL, 2006).

O advento da biologia molecular, diversas técnicas para detecção de microorganismos foram possibilitadas, favorecendo ao aumento da sensibilidade e especificidade do diagnóstico (ZARLENGA; HIGGNIS, 2001).

Justifica-se este estudo para a detecção do comércio informal do leite em Alagoas, pois ainda não está bem estabelecida a informalidade nesse comércio, além de pesquisar através da PCR a presença de *Brucella sp.* no leite “*in natura*” comercializado, haja vista a relevante importância quanto ao aspecto de produção do leite bovino e riscos à saúde pública.

4.2.2 Metodologia (Biologia Molecular)

4.2.2.1 Extração de DNA

Como pré-etapa da extração de DNA foi adotada uma centrifugação prévia dos 50 mL de volume total do leite colhido, sendo realizada uma centrifugação inicial a 3000 rpm durante 10 minutos, com descarte do sobrenadante e, transferência do *pellet* obtido para um novo criotubo estéril de 2mL devidamente identificado, realizando-se uma nova centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos, obtendo-se por fim o *pellet* final para extração, rico em conteúdo celular. As amostras de leite foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial DNEasyBlood&Tissues (Qiagen) utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante, sendo ao final do processamento, armazenado em -20°C até a realização dos testes moleculares.

4.2.2.2 Detecção do DNA de *Brucella sp.*

As amplificações do DNA de *Brucella sp.* foram realizadas utilizando-se os *primers* ITS66 (5'-ACATAGATCGCAGGCCAGTCA-3') e ITS 279 (5'-AGATACCGACGCAAACGCTAC-3') que amplificam a região ITS 16S-23S do RNAr, específica para o gênero *Brucella* (KEID et al., 2007).

As reações foram preparadas em criotubos de 200µL, tendo como volume final 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 0,5µL de cada *primer* específico para o agente na concentração de 10 pmol; 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Qiagen®. O perfil térmico das etapas das reações foi realizado em termociclador (XP ThermalCycler - Bioer Technology CO. LTD), consistindo de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos para a desnaturação, 62°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 30 segundos para a extensão, e extensão final de 72°C por 5 minutos, conforme Keid et al. (2007).

A verificação do produto amplificado de 214 pares de bases (pb), correspondentes ao fragmento amplificado pelos *primers* correspondentes ao agente, foi realizada por meio de eletroforese de gel de agarose a 2%, onde os produtos da PCR foram corados com Blue Green (LGC Biotecnologia), visualizados através de luz ultravioleta e foto documentados. Para comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados, foi utilizado marcador molecular de padrão de 100 pb (Fermentas).

Realizou-se análise estatística descritiva por conveniência, com amostra aleatória simples (SAMPAIO, 2002).

4.3 Resultado

Dos 102 municípios totais do Estado de Alagoas, foi identificada a existência do comércio informal de leite em 80 municípios, dos quais 15 municípios tiveram mais de um ponto de comercialização identificados, sendo um município com quatro pontos de comercialização, três municípios com três pontos e 11 municípios com dois pontos de venda de leite informal, confirmando a presença deste mercado ilegal de venda de leite em Alagoas.

Das 100 amostras de leite informal submetidas a PCR para a detecção de *Brucella sp.* apenas uma (1/100) foi positiva para o gênero (Figura 3).

4.4 Discussão

Segundo Fonseca e Carvalho (2004) a comercialização de produtos lácteos sem inspeção no Brasil atinge níveis extremamente elevados, independente da interpretação que se dê as estatísticas, tradicionalmente, considera-se que 45% do leite produzido advém da produção e comercialização informal. A Região Nordeste apresentou, em 2010, o menor percentual do leite sob inspeção, em relação ao total do leite produzido (apenas 30,7%). Isto significa que quase 70% do que é produzido na região são consumidos de forma “in natura”. Considerando que este percentual já foi menor - em 1997 era 23,3%, apesar de forma lenta a região vem apresentando alguma evolução no processo de industrialização (REIS FILHO; SILVA, 2013).

Características próprias de cada região conferem a sistemas de produção de subsistência o atendimento à demanda do mercado, sendo o excedente deste consumo familiar comercializado diretamente com o consumidor final sem nenhum tipo de tratamento (BELLOTI, 2001).

Nos Estados Unidos a *Brucella sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni* são apontados como microrganismos patogênicos para humanos associados ao consumo de leite cru de vacas, cabras e ovelhas (VERRAES et al. 2015). Em 64 surtos causados pelo consumo de queijo cru em diferentes países foram identificados 7 por *Brucella sp.*, 8 por *Listeria monocytogenes* e 5 por *Campylobacter jejuni* (EFSA; ECDC, 2014). Nos países mediterrâneos, aqueles não oficialmente livres da brucelose, presume-se que o consumo de

leite cru oriundo de ovelhas e cabras, bem como os queijos artesanais oriundos desse produto são a principal fonte para infecção humana (FASFC; WIV; CODA, 2011). Verraes et al. (2015) ressaltam que mesmo durante a produção de queijos macios pode haver crescimento de *Brucella sp.*, com sobrevivência da bactéria no processo de maturação e armazenamento do queijo.

Os métodos de cultivo microbiológico e análises fenotípicas de crescimento bacteriano são empregados como testes de referência para detecção de *Brucella sp.* em amostras biológicas, levando a baixa sensibilidade no isolamento bacteriano associado ainda a característica fastidiosa de crescimento do agente (AMOROSO et al., 2011). A quantidade do patógeno na amostra clínica, o estágio da infecção, bem como o uso de antibióticos antes do diagnóstico microbiológico são ainda citados como fatores limitantes para o isolamento (MOHAMED et al., 2010). Tratando-se ainda de um patógeno classe III existe significativo risco biológico em situações laboratoriais (NING et al., 2012). Métodos sorológicos indiretos como o ELISA e o teste no anel no leite tem sido utilizados para detecção de anticorpos anti-*Brucella* no leite (VANZINI et al., 2001; CHAND et al., 2005), onde resultados duvidosos podem ser gerados através do uso extensivo de vacinas, o que incrementaria a resposta imune vista em resultados de uma infecção em curso (NIELSEN, 2002). Por conta dessas limitações, o uso de técnicas moleculares, como a PCR, vem sendo aplicadas cada vez mais pensando na rapidez, no baixo risco biológico e no incremento da sensibilidade (AMOROSO et al., 2011).

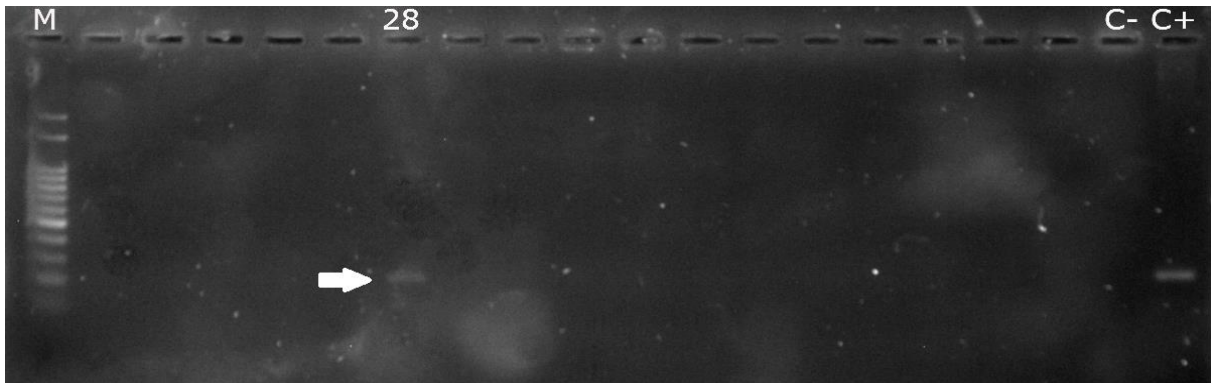
No Brasil, De Paula et al. (2013) detectaram a presença de *Brucella sp.* por PCR em 30 amostras de leite cru comercializadas clandestinamente e 50 amostras de leite entregues em laticínios, previamente à pasteurização na cidade de Botucatu-SP, encontrando positividade em 12,5% (10/80) das amostras totais analisadas, dentre as positivas 16,6% (5/30) eram provenientes do comércio clandestino e 10% (5/50) de laticínios.

Ainda na região Sudeste do Brasil, utilizando queijo oriundo de comércio ilegal, estudos comparativos entre técnicas de isolamento microbiológico e detecção molecular de *Brucella abortus* foram realizadas por Myashiro et al. (2007). Nas 192 amostras totais utilizadas não houve isolamento do microrganismo através de cultivo bacteriano, porém 19,27% (37/192) das amostras foram positivas para o gênero *Brucella*, com confirmação em todas (100%) para a espécie *B. abortus*. A diferenciação entre as cepas nas amostras positivas foi realizada, encontrando resultados de 81,08% (30/37) para a cepa vacinal B19 e 18,92% (7/37) diferenciadas como cepas de campo de *B. abortus*.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Numa comparação dos testes sorológicos convencionais e culturas de sangue com ensaios de PCR, em brucelose aguda, Mitka *et al.* (2007) concluíram que o ensaio por PCR consegue diagnosticar mais rapidamente a enfermidade que os métodos convencionais, com percentuais similares de confiabilidade.

A detecção da *Brucella sp.* utilizando PCR tem sido pesquisada em diferente tipos de materiais biológicos e espécies (OCAMPO-SOSA *et al.*, 2005).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% de produtos amplificados na PCR para detecção de fragmento de 214 pb (pares de base) referentes a região ITS1 de *Brucella sp.* Marcador molecular de 100pb (M); amostra de leite positiva para DNA de *Brucella sp.* (28); controle negativo (C-); controle positivo (C+).



Estes testes estão sujeitos a interferências decorrentes da idade de vacinação, de infecções recentes ou de reações cruzadas com outros agentes. A utilização da combinação de diferentes métodos, tal como um teste de triagem capaz de identificar animais soro reagentes e um teste confirmatório que separe, dentre estes, os verdadeiros positivos dos negativos, associada à informação epidemiológica e clínica do rebanho e importante para que se chegue a um diagnóstico conclusivo (FIGUEREDO, 2008).

Com os dados apresentados sugere-se a realização de um inquérito soro-epidemiológico do rebanho Alagoano pela falta de informação sobre a Brucelose, bem como, é imperativa a presença do Estado com Políticas Públicas voltadas a coibir o comércio ilegal de leite e implantar programas de Educação Sanitária levando para sociedade a importância de se conhecer a origem dos produtos que levamos a nossa casa.

4.5 Conclusão

Conclui-se com este estudo que existe o comércio ilegal do leite em Alagoas e a presença da *Brucella sp.* em leite bovino, pode representar um risco de transmissão da Brucelose para população que consome o leite comercializado informalmente.

REFERÊNCIAS

AMOROSO, M. G.; SALZANO, C.; CIOFFI, B.; NAPOLETANO, M.; GAROFALO, F.; GUARINO, A.; FUSCO, G. **Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella sp.* in water buffalo milk.** *Food Control*, v. 22, p. 1466-1470, 2011.

BELOTI, V. **Leite clandestino: quem tem medo do lobo mau?** Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/mn/>>, 2001. Acesso em: 15 de abril de 2015.

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S.; SILVA, L. C. C.; FAGNANL, R.; REIS, K. T. M. G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade.** Londrina: Editora Planta, 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.

CHAND, P.; RAJPUROHIT, B. S.; MALHOTRA A. K.; POONIA, J. S. Comparison of milk ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 305-311, 2005.

CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; Lemos, R. A. A.; BORGES, J. R. J., **Doenças de ruminantes e equinos.** Santa Maria, Pallotti, 2007.

European Food Safety Authority (EFSA). **SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012.** **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 3547., 2014.

European Food Safety Authority (EFSA). **Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk.** **EFSA Journal**, v. 13, p. 3940, 2015.

FIGUEIREDO, A. O. **Diagnóstico Sorológico da Brucelose Bovina**. Especialização *Latu sensu* em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal – UCB - Campo Grande – MS, 2008.

FONSECA, L. F. L.; CARVALHO, M. P. **Leite Políticas e Derivados**. Ed. Quiron Comunicação e Conteúdo, p. 74-77, 158, 2004.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, A. S. A.; CHIE-BAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHEIN, L. J. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1260-1270, 2007.

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

MESQUITA, I. V. U.; MEDEIROS A. N. Efeito da dieta na composição química e características sensoriais do leite de cabras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora: v. 59, n. 337, 2004.

MITIKA, S.; CONTANTINE, A.; EFIMIA, S.; EUDOXIA, D.; ATHINA K. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1211-1218, 2007.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p. 447-459, 2002.

NING, P.; GUO, K.; XU, L.; XU, R.; ZHANG, C.; CHENG, Y.; CUI, H.; LIU, W.; LV, Q.; CAO, W.; ZHANG, Y. Short communication: Evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4863-4867, 2012.

OCAMPO-SOSA, A. A.; AGUERO-BALBIN, J.; GARCIA-LOBO, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 the new subgroup 3b of biovar 3. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.110, p. 41-51, 2005.

PAULA, C. L.; MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C. M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF, S. D.; MEDIJ, J. Detecção de *Brucella sp.* em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arq. Int. Biol.** São Paulo, v 82 1-5, 2015.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. FEP-MVZ, Belo Horizonte, 2002. 265p

SELEEM M. N.; BOYLE, S. M.; SIRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 392-398, 2010.

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N. P.; VALENTINI, B. S.; TORIONE DE ECHAIDE, S.; LUGARESI, C. I.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 55–60, 2001.

VERRAES, C.; VLAEMYNCK, G.; VAN WEYERNBERG, S.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G.; SINDIC, M.; UYTTENDAELE, M.; HERMAN, L. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **Internacional Dairy Journal**, v. 50, p. 32-44, 2015.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINIS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, 101, pp. 215-230, 2001.