

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Rômulo Tadeu Pace de Assis Lage

**PESQUISA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*, MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS E ACTINOMICETOS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL NA
MICRORREGIÃO DO SERRO EM MINAS GERAIS**

Juiz de Fora – MG

2016

Rômulo Tadeu Pace de Assis Lage

PESQUISA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*, MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS E ACTINOMICETOS EM QUEIJO MINAS ARTESANAL NA
MICRORREGIÃO DO SERRO EM MINAS GERAIS

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Juiz de Fora – MG, 2016

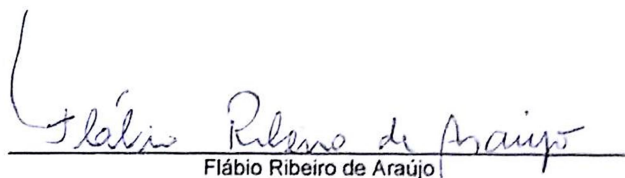
**Pesquisa de *Mycobacterium bovis*, micobactérias não
tuberculosas e outros actinomicetos em queijo minas artesanal
na microrregião do Serro em Minas Gerais**

Rômulo Tadeu Pace de Assis Lage

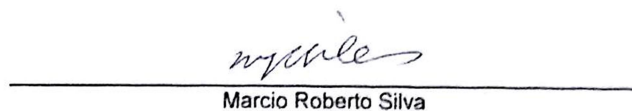
ORIENTADOR (A): Marcio Roberto Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 25/08/2016.


Flávio Ribeiro de Araújo


João Batista Ribeiro


Marcio Roberto Silva

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lage, Rômulo Tadeu Pace de Assis.

Pesquisa de mycobacterium bovis, micobactérias não tuberculosas e actinomicetos em queijo minas artesanal na microrregião do Serro em Minas Gerais. / Rômulo Tadeu Pace de Assis Lage. – 2016.

78 p.

Orientador: Marcio Roberto Silva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2016.

1. Actinomicetos. 2. Micobactérias não tuberculosas. 3. Zoonose. 4. Queijo Minas Artesanal. 5. Segurança do Alimento. I. Silva, Marcio Roberto, orient. II. Título.

A toda minha família,
pelo companheirismo, amor e paciência em entender
os meus momentos de ausência, aos meus filhos,
Pedro e Valentina, pelo amor incondicional,
e alegria em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTO

À minha família, especialmente à minha **esposa, filhos, mãe, pai** pelo amor, carinho e apoio incondicional em mais essa etapa de minha vida. Vocês são o incentivo dessa conquista.

À **Embrapa Gado de Leite** por viabilizar financeiramente e tecnicamente minha formação acadêmica (mestrado).

Ao **Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)**, pelo reconhecimento da importância do desenvolvimento desse trabalho, e em especial aos amigos da **Coordenadoria Regional de Montes Claros** pelo apoio e esforços realizados para suprir a minha ausência.

À **Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF**, à **Embrapa Gado de Leite** e ao **Instituto de Laticínios Cândido Tostes** pelos ensinamentos passados.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Márcio Roberto Silva**, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, pela paciência, amizade, conselhos, “puxões de orelha” e orientação durante toda a caminhada acadêmica e, principalmente, por acreditar que nosso projeto pudesse ser concretizado mesmo com as dificuldades geradas pela distância.

A todos os **professores** do programa de pós-graduação pela socialização, construção do conhecimento e dedicação profissional.

Aos **funcionários da EMBRAPA GADO DE CORTE – Campo Grande/MS**, em especial ao **Dr. Flávio Ribeiro de Araújo**, pelo excelente trabalho de pesquisa desenvolvido, contribuindo para o desenvolvimento do estudo. Sem você essa conquista não seria possível.

Aos componentes da **banca examinadora**, por se dedicarem em contribuir intelectualmente para o aprimoramento deste trabalho.

Ao meu grande amigo, **André Almeida Santos Duch**, pela amizade, companheirismo e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho. Essa conquista também é sua.

A todos os **colegas** de mestrado, pela troca de conhecimento e agradável convívio. Momentos prazerosos ficarão na memória.

Aos **produtores rurais** que se dedicaram em facilitar o desenvolvimento do trabalho e troca de informações.

Enfim, às pessoas que aqui não foram citadas, mas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi pesquisar a ocorrência de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas (MNT) e Actinomicetos em Queijo Minas Artesanal (QMA) da microrregião do Serro. Avaliou-se a presença dos patógenos por meio de cultivo bacteriano em queijos com períodos de maturação em temperatura ambiente entre 4 e 8 dias, em queijarias certificadas ou cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que possuem assim o aval do órgão para o comércio estadual. Todas as amostras de queijos foram provenientes de rebanhos submetidos ao teste de tuberculização intradérmica comparada, conforme disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), realizado por médico veterinário particular credenciado no programa, apresentando resultado negativo. Das amostras coletadas (n = 55), 4 (7,27%) apresentaram resultados positivos (4/55) para microrganismos de crescimento rápido em meio Stonebrink. Estes isolados das amostras de queijos positivas foram submetidos à amplificação gene *hsp65* do DNA por PCR, sequenciamento de DNA e sua comparação com as sequências depositadas no banco de dados “Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide” (BLASTn), não restringindo a busca para gênero ou espécie. As sequências identificadas apresentaram maior similaridade com as espécies *Mycobacterium novocastrense* (uma amostra), *Gordonia bronchialis* (três amostras). Não foram encontrados resultados positivos para *M. bovis*. Enfim, a presença de DNA de *M. novocastrense* e *G. bronchialis* nas amostras sugere necessidade de medidas de identificação e controle mais rigorosas, tanto em nível de rebanho como na matéria prima e no produto acabado. Essa lacuna na legislação seria algo para reflexão, dada a importância das micobactérias não tuberculosas e de outros Actinomicetos à saúde pública, principalmente quando destinados a grupos específicos como pacientes com imunossupressão.

Palavras-chave: Actinomicetos; Micobactérias não tuberculosas; Zoonose; Queijo Minas Artesanal; Segurança do alimento.

ABSTRACT

The aim of this study was to estimate the occurrence of non-tuberculous Mycobacteria and other Actinomycetes in artisanal cheeses, named of “Queijo Minas Artesanal” (QMA), from Serro, a micro region of Minas Gerais state, Brazil. The presence of pathogens in cheeses with ripening between 4 and 8 days at room temperature means cultivation and molecular speciation methods was evaluated. QMA has been certified or registered by “Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)”, which has endorsed its interstate trade over the country. Of the samples collected (n = 55), 4 (7.27%) showed positive results (4/55) for fast-growing micro-organisms by means of bacterial culture. These isolates from cheeses positive samples were submitted to DNA amplification by PCR, DNA sequencing and its comparison with the sequences deposited in “Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide” (BLASTn) database, not restricting the search to genus or species. The sequences identified presented higher similarity with *Mycobacterium novocastrense* (a sample), non-tuberculous mycobacteria (NTM) and *Gordonia bronchialis* (three samples) species. All samples of cheeses were from herds subject to intradermal comparative test, as provided by Brazilian programme for the control and eradication of brucellosis and tuberculosis, performed by private accredited veterinarian, showing negative results. Finally, the presence of DNA of *Mycobacterium novocastrense* and *Gordonia bronchialis* in cheeses suggests a supposed disability in the current control of pathogens program, as well as the need for identification measures and stricter control, either at the level of flock as raw materials and the finished product. This gap in the legislation would be something for reflection, given the importance of NTM and other Actinomycetes to public health, especially when aimed at specific groups such as patients with immunosuppression.

Key words: Actinomycetes; Non-tuberculous Mycobacteria ; Zoonosis ; Queijo Minas Artesanal ; Food safety .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento.....	34
Tabela 2: Classificação das Micobactérias de acordo com a patogenicidade.....	35
Tabela 3: Trabalhos publicados sobre Micobactérias não Tuberculosas em alimentos.....	42
Tabela 4: Sequências consensos dos isolados das amostras 46, 53 e 54.....	51
Tabela 5 – Caracterização, número de pares de base sequenciados e pareados e similaridade das amostras positivas.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa das regiões produtoras de queijo minas artesanal.....**21**
- Figura 2:** Mapa da Microrregião do Serro produtora de Queijo Minas Artesanal.....**24**
- Figura 3:** Mapa da distribuição das propriedades selecionadas para as coletas, microrregião do Serro, Minas Gerais, 2014.....**47**

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Resultado Amostra 46.....	74
Anexo B: Resultado Amostra 49.....	75
Anexo C: Resultado amostra 53.....	76
Anexo D: Resultado amostra 53.....	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AOC	Appellation d' Origine Contrôlée
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
DAP	Ácido mesodiaminopimélico
DOP	Denominação de origem protegida
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
GA	Glutaraldeído
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INLAB	Bolsas estéreis para amostras sólidas ou líquidas
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
LJ	Lowenstein-Jensen
LQL	Laboratório de Qualidade do Leite
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MG	Minas Gerais
MNT	Micobactérias não tuberculosas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
QMA	Queijo Minas Artesanal
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
UFV	Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	16
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 – HISTÓRIA DO QUEIJO	18
2.1.1 HISTÓRIA DO QUEIJO NO BRASIL.....	19
2.1.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES PRODUTORAS DE QMA.....	20
2.1.3 – HISTÓRIA DO QUEIJO DO SERRO	22
2.2 –QUEIJO MINAS ARTESANAL: LEGISLAÇÕES E NORMAS	24
2.2.1 – O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO QMA E REQUISITOS PARA SUA QUALIDADE E SEGURANÇA.....	26
2.2.1.1 Estrutura Física da Queijaria.....	27
2.2.1.2. Equipamentos e Utensílios.....	28
2.2.1.3. Água.....	29
2.2.1.3. Leite.....	29
2.2.1.4. Embalagem.....	30
2.2.1.5. Transporte	30
2.2.1.6. Fiscalização	30
2.2.2 - CONTROLE SANITÁRIO.....	31
2.2.2.1 - Vacinações.....	31
2.2.2.2 - Diagnóstico	31
2.2.2.3 - Tratamento Dos Animais.....	32
2.3 – MICOPATIAS ATÍPICAS (MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS) E OUTROS ACTINOMICETOS	32
2.3.1 – CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS	32
2.3.2 – MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO.....	36

2.3.3 OUTROS ACTINOMICETOS.....	37
2.3.4 - EMPIDEMIOLOGIA	39
2.3.4.1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MNT	39
2.3.4.2 - FONTES DE INFECÇÃO E MODOS DE TRANSMISSÃO DAS MNT E OUTROS ACTINOMICETOS PARA SERES HUMANOS	42
3 - OBJETIVO	45
3.1. OBJETIVO GERAL	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1. DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO.....	46
4.2. PLANEJAMENTO AMOSTRAL.....	46
4.3. COLETA DE DADOS SOBRE AS PROPRIEDADES E OS PRODUTORES ..	47
4.4. COLETA DE AMOSTRAS DE QUEIJO	48
4.5 - CULTIVO DE MICOBACTÉRIAS	48
4.6 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	49
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	50
5. RESULTADOS.....	50
6 - DISCUSSÃO	53
7- CONCLUSÃO	62
8 – REFERÊNCIAS.....	63
9 - ANEXOS.....	74
Anexo A.....	74
ANEXO B	75
Anexo C	76
Anexo D	77

1 – INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, permanecendo por várias décadas até os dias atuais como um dos principais responsáveis pela geração de renda de um grande número de pequenos produtores rurais em várias regiões do estado.

A sua produção centenária não apenas impulsiona a economia local, mas também exerce um grande papel sócio-cultural, sendo sua história confundida com a própria história das regiões.

A lei n.º 14.185, de 31 de Janeiro de 2002 define o QMA como “...o queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas” (MINAS GERAIS, 2002c).

A produção do queijo artesanal nas fazendas mineiras é altamente relevante para a composição da renda de fazendeiros tradicionais e para a manutenção de suas propriedades rurais. Dos 853 municípios mineiros, mais de 500 produzem queijo artesanal. A Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) do Estado de Minas Gerais estima uma produção de 3.600 toneladas/mês, envolvendo um montante financeiro da ordem de 10 milhões de reais/mês e promovendo 120 mil empregos diretos e 40 mil indiretos (MINAS GERAIS, 2002a).

Embora o Estado de Minas Gerais como um todo tenha vocação para a produção destes queijos, apenas sete tradicionais regiões produtoras são reconhecidas pela EMATER-MG e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), sendo elas: Serro, Serra da Canastra, Cerrado (Antigo Alto Paranaíba), Serra do Salitre, Araxá, Campos das Vertentes e Triângulo Mineiro (MINAS GERAIS, 2002g, 2002h, 2003, 2004, 2007, 2009, 2014a, 2014b).

Em razão desta importância, os produtores de queijo artesanal se associam há alguns anos, na tentativa de organizar, definir padrões e melhorar a qualidade biológica do produto, através do gerenciamento da produção e da comercialização, bem como de práticas sanitárias controladas para o rebanho e formas de produção higiênicas visando a segurança alimentar de seu produto para os consumidores,

contando com o apoio de instituições públicas, privadas e organizações não governamentais (PIRES, 2013).

Com a utilização do leite cru como sua principal matéria prima, o QMA pode representar um maior risco à saúde dos consumidores, podendo ser considerado um produto com maior potencial de veiculação de microrganismos patogênicos que o produzido a partir de leite pasteurizado.

No Brasil, diversos surtos de doenças de origem alimentar associados ao consumo de queijos artesanais tem ocorrido, principalmente, por enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus*.

S. aureus apresenta um potencial risco de contaminação, não apenas dos queijos artesanais, mas de diversos alimentos, seja durante o preparo, o processamento, seja, durante a estocagem. De janeiro de 2006 a julho de 2008 foram investigados 139 surtos de toxinfecção alimentar ocorridos em 73 municípios mineiros. Sessenta e quatro surtos (46,0%) foram confirmados como intoxicação estafilocócica e com registro do envolvimento de 1418 pessoas. Entre as doenças transmitidas por alimentos, as intoxicações estafilocócicas representam uma parcela expressiva das notificações de surtos ocorridos nos municípios mineiros (DIAS, 2008).

SESSO, WYTON e PINTO (2005) relataram um surto de glomerulonefrite aguda que ocorreu entre 1997 e 1998 em pessoas que residiam na região de Nova Serrana-MG, Brasil, sendo *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* o agente isolado em pacientes, trabalhadores agrícolas e fabricantes de queijo fresco provenientes da agricultura familiar, sendo este o único alimento consumido em comum pela maioria dos pacientes que apresentaram a afecção.

Outro grupo de microorganismos potencialmente transmitidos pela ingestão de leite cru são os do gênero *Mycobacterium spp.*, destacando-se *Mycobacterium bovis*, que tem um amplo espectro de patogenicidade para as espécies domésticas e silvestres, principalmente bovinos e bubalinos, podendo participar da etiologia da tuberculose humana, causando a tuberculose zoonótica (ROCHA et al 2014). Além de *M. bovis*, outras micobactérias não tuberculosas como as do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), que inclui a espécie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, associada à doença de Crohn em seres humanos (CUNHA,2009) e as micobactérias de crescimento rápido (MCR).

O autor e os orientadores dessa dissertação desconhecem trabalhos relacionados à prevalência de *M. bovis* e MNT em QMA. Portanto, o objetivo principal desse trabalho foi pesquisar a ocorrência de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas (MNT) e Actinomicetos em QMA frescos (maturação variando de 4 a 8 dias) oriundos das propriedades produtoras da microrregião do Serro cadastradas no IMA. Além disto, estudar os possíveis impactos da presença deste grupo de micobactérias à saúde pública e propor melhorias para o controle dos referidos patógenos nos produtos oriundos das queijarias artesanais.

Esse trabalho faz parte do Projeto “Desenvolvimento da agricultura familiar por meio da promoção e aprimoramento agroindustrial artesanal rural em territórios de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia”, coordenado pelo Dr. Rodrigo Paranhos (código SEG 06.11.01.012.00.00), Embrapa Agroindústria de Alimentos, o qual possui um plano de ação intitulado “Detecção de agentes zoonóticos e contaminantes químicos, riscos potenciais para a sua ocorrência, percepção dos envolvidos e implantação de um processo de educação continuada no sistema produtivo do queijo artesanal do Serro (MG)”, código SEG 06.11.01.012.00.06, coordenado pelo Dr. Marcio Roberto Silva, orientador dessa dissertação.

Este projeto contou ainda com recursos financeiros de outros projetos: FUNDECT TO 085/2015, Embrapa 02.13.10.008.00, Embrapa 02.13.10.007.00.00 e CNPq 443235/2014-7, Fapemig CVZ - APQ-02746-14 e Fapemig CVZ - PPM-00526-16.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – HISTÓRIA DO QUEIJO

O queijo é um dos alimentos mais antigos registrados em toda história da humanidade. A arte de sua fabricação remonta ao ano 10.000 a.C., época da domesticação de cabras e ovelhas pelos pastores egípcios, um dos primeiros povos que utilizaram o leite e o queijo como fontes importantes de alimentação (MINAS GERAIS 2002b).

Na antiguidade clássica, Grécia e Roma iniciaram o processo produtivo do queijo. Mas, foi especialmente em Roma que se pode colher elementos que

ajudaram a explicar a origem da fabricação do queijo que ainda persiste nos dias atuais, justificando-se o emprego da palavra queijo, *caseus*, do latim (MINAS GERAIS 2002b).

Acompanhando a expansão do Império Romano pela Europa, o queijo e suas variedades ganhavam território e admiração. Em Roma aconteceram também os primeiros registros de que produtores começaram a utilizar a adição de coalho extraído do quarto estômago de cordeiros ou cabritos, *coagulum*, e a descrição da técnica de obtenção do queijo a partir do leite fresco (PIRES, 2013).

Os primeiros registros de industrialização do queijo datam no século XVII, em que a máquina substituiu a mão de obra familiar, trazendo ganho de tempo no beneficiamento do leite e condições de acompanhar o aumento da demanda de queijo pelos consumidores (PIRES, 2013).

Com adaptação aos gostos e costumes de diversas culturas por todo mundo, o queijo ganhou uma grande multiplicidade de processos de fabricação e tipos, sendo produzido e consumido em todo mundo.

2.1.1 HISTÓRIA DO QUEIJO NO BRASIL

Um marco na história do queijo no Brasil foi a chegada da corte portuguesa que revolucionou a culinária da época, então baseada em poucos ingredientes como milho, carne de porco, mandioca e feijão. Em 1532 algumas vacas foram trazidas pelos portugueses e junto com elas, trouxeram o hábito de consumo de queijos fazendo surgir incontáveis queijarias para atender a demanda desses imigrantes, sendo que a primeira queijaria brasileira, historicamente documentada, foi fundada em 1581 na Bahia (DIAS, 2010).

Com relação à origem do queijo artesanal de Minas Gerais, vários estudos relatam que as raízes de origem encontram-se nas técnicas típicas da serra da Estrela, em Portugal. Esse modo de fazer foi trazido ao Brasil no século XVI para garantir a sobrevivência de colonos ibéricos, de indivíduos luso-brasileiros e também de mineiros dos tempos antigos até hoje (IPHAN, 2006; DIAS, 2010).

Por outro lado, MARGAREJO NETTO (2011), defende que a origem da técnica de produção do queijo em Minas veio do arquipélago dos Açores por imigrantes que se estabeleceram em Caeté e em Medeiros no século XVIII, os quais foram tratados como portugueses e não como açorianos. Estes já conheciam a técnica do manejo com gado leiteiro e a técnica artesanal de produção de queijo que aprenderam com os holandeses, que visitavam o arquipélago naquele tempo.

2.1.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES PRODUTORAS DE QMA

Em países que preservam a tradição de produtos artesanais – e um exemplo importante é a França – a delimitação da área geográfica da produção e a certificação de origem do produto são providências fundamentais que lhe garantem o destaque merecido, além de protegê-lo contra falsificação e investidas burocráticas.

Individualizados em territórios distintos, as regiões produtoras de queijo artesanal mineiro podem ser demarcadas espacialmente, em função de características geomorfológicas e culturais, originando queijos com características organolépticas distintas, mas com uma proximidade muito grande de seus modos de fazer, todos eles baseados na mesma técnica original portuguesa dos tempos coloniais.

Os fatores físico-naturais de cada uma dessas regiões propiciam pastagens naturais típicas e o desenvolvimento de bactérias específicas que se multiplicam em cada um desses microclimas e dão a cada queijo aparência e sabor específicos.

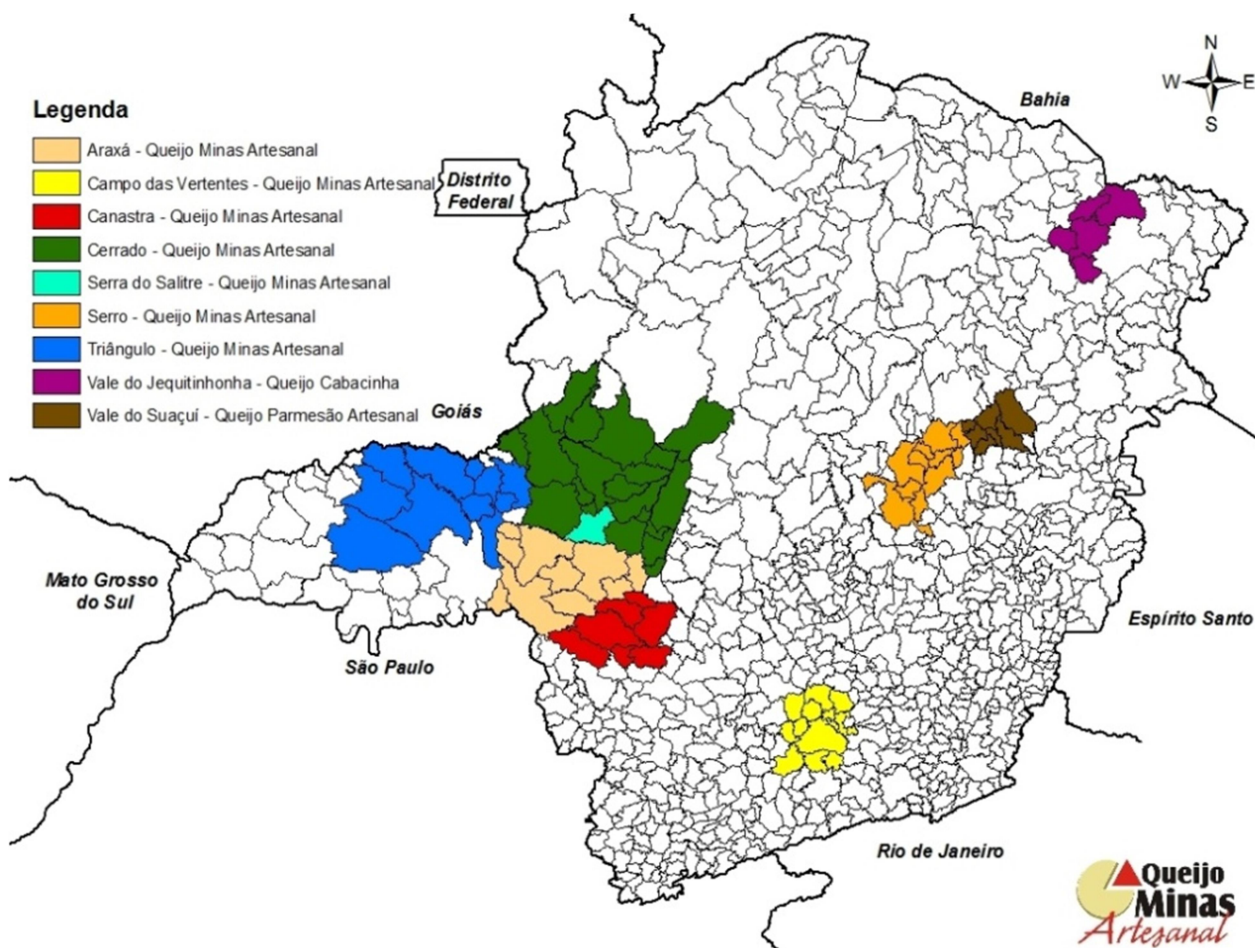
O fermento que dá as características específicas ao queijo, chamado de “pingo”, é composto por um grupo de bactérias lacto-fermentativas típicas de cada região. Este é obtido com o soro que drena dos queijos recém-produzidos durante a tarde e a noite do primeiro dia de maturação. É um acervo bacteriano responsável pelo padrão de cada região e reflete a ambiência de cada território, em suas especificidades.

A esses fatores somam-se vários aspectos socioculturais que criaram um modo de fazer próprio na manipulação do leite, dos coalhos, das massas, das

formas de prensagem, da cura, e da tradição comercial. A esse modo de fazer acrescentam-se formas de viver, significados atribuídos, sentidos e simbologias aderidas (MINAS GERAIS 2002b).

Conforme determina a Lei Estadual 14.185/02, foram feitos estudos históricos, agrogeológicos e edafoclimáticos, para identificar e caracterizar as regiões tradicionalmente produtoras do QMA.

FIGURA 1 – Mapa das regiões produtoras de queijo minas artesanal



FONTE: EMATER 2014

Tanto as microrregiões como os municípios que as compõem serão identificados em portarias específicas sempre que houver solicitação junto ao IMA, por meio de organizações representativas dos produtores, mediante a realização estudos feitos pela EMATER/MG e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que comprovem através da caracterização da região, sua tradição histórica e cultural na atividade.

2.1.3 – HISTÓRIA DO QUEIJO DO SERRO

A base de produção do QMA do Serro foi a técnica portuguesa utilizada na Serra da Estrela. Porém, com o tempo foi apresentando algumas variações que o diferenciaram em relação ao original, por exemplo, no que diz respeito ao coagulante. Enquanto a receita original previa a aplicação de extrato de flores e brotos de cardos, a do Serro passou a incluir um coagulante desenvolvido a partir de estômago seco e salgado de bezerro ou cabrito (RIBEIRO, 1959; PIRES, 2003).

Com a decadência do ciclo do ouro, o município do Serro intensificou sua atividade agropecuária e no momento de expansão, o queijo foi o produto que garantiu divisas para a região, pela qualidade e pelo volume que representou para o mercado. A partir de então, o Queijo do Serro consagrou-se como símbolo de representação e de identidade cultural pelo peculiar sabor e modo de produção (MINAS GERAIS 2002b).

A cidade do Serro irradiou a produção de queijo que leva o seu nome para as regiões vizinhas. Fica localizada numa região montanhosa, na vertente oriental da Serra do Espinhaço, entre os paralelos 18º e 19º de latitude Sul na região do Alto do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS 2002a). A região possui um clima Tropical de Altitude, com temperatura média anual em torno de 20º C, com a média mínima de 14º C e a média máxima de 27,5º C, com chuvas bem distribuídas entre os meses de setembro a março, com índice pluviométrico médio em torno de 1300 mm anuais, altitude variando de 600 a 1200 m e um relevo com cerca de 11% de área plana, 22% de área ondulada e 67% de área montanhosa (MINAS GERAIS 2002a).

Entre os fatores determinantes que, historicamente, induziram os produtores de leite da região a converterem sua produção em queijos está o isolamento da

área, provocado tanto pela presença a oeste da Serra do Espinhaço como pelo reduzido número de estradas de rodagem, que ainda hoje representa um sério obstáculo ao desenvolvimento dos municípios da região (MINAS GERAIS 2002a).

As condições físico-ambientais da região, são fatores que parecem mais determinantes para explicar a existência de suas características peculiares. As altitudes, as condições geomorfológicas, as condições edáficas e as características microclimáticas locais propiciaram o aparecimento de pastagens naturais onde predominam o capim gordura (ou meloso) e capins típicos dos campos de altitude (MINAS GERAIS 2002a, 2002b).

A sabedoria de antigos fazendeiros ensina que o gado comum é o que se adapta mais facilmente às montanhas, e que a criação bem sadia com pêlo assentado e úberes livres de mastite garantem a qualidade do queijo (PIRES, 2003).

Desses mesmos saberes, colhem-se as assertivas de que os capins nativos, especialmente o meloso, interfere na consistência do queijo e que as pastagens formadas artificialmente devem ser conjugadas com capim nativo para a preservação das características do leite (PIRES, 2003).

Vários trabalhos científicos destacam as características peculiares do QMA do Serro. RIBEIRO (1958 e 1959) já ressaltava o tecnologia de fabricação do QMA, demonstrando que não é recente o interesse nos queijos artesanais.

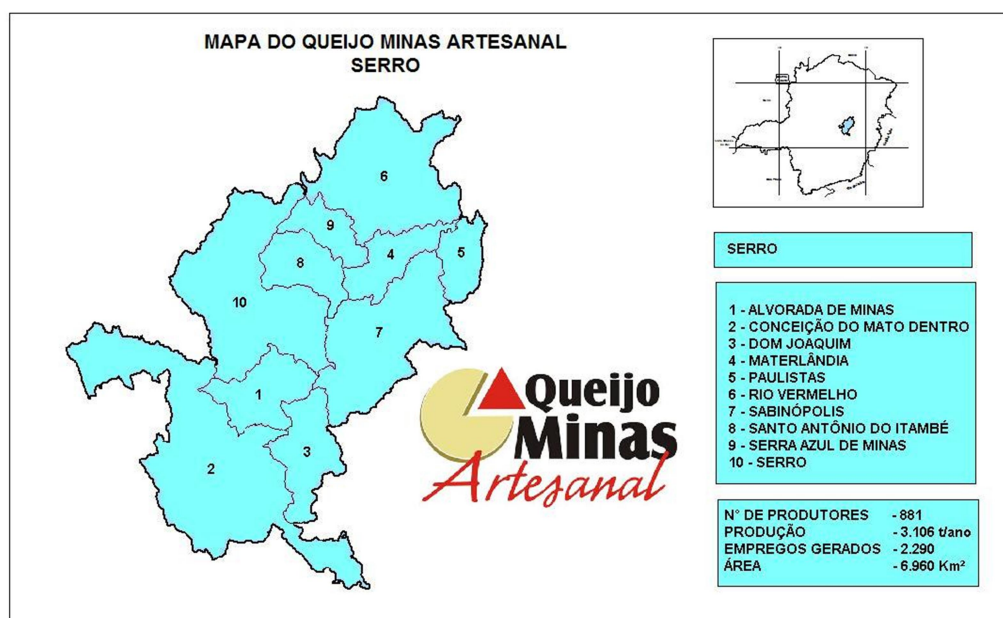
Trabalhos realizados mais recentemente pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) se aprofundaram na caracterização físico-química e na identificação de cada etapa do processo de produção, descrevendo os diferenciais do QMA do Serro, como o realizado por PIRES, 2003.

Apesar de toda sua história somente por meio da Portaria nº 546 do IMA, de 29 outubro de 2002, foi delimitada a microregião do Serro como produtora de um QMA diferenciado.

De acordo com a Portaria esta é composta pelos municípios de Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas e Serro.

Em 26 de maio de 2003, a Portaria nº 591, também do IMA incluiu o município de Paulistas na lista dos municípios da Microrregião.

FIGURA 2 - Mapa da Microrregião do Serro produtora de Queijo Minas Artesanal



FONTE : (MINAS GERAIS 2002a)

2.2 –QUEIJO MINAS ARTESANAL: LEGISLAÇÕES E NORMAS

São vários os países que buscam preservar legalmente seus queijos artesanais de leite cru, através de instrumentos formais de reconhecimento e de interpretação de modos de fazer, como é o caso da Appellation d' Origine Contrôlée (AOC), na França.

A AOC designa os produtos que satisfazem os critérios da denominação de origem protegida (DOP), aqueles cujas etapas principais de produção são realizadas de acordo com a experiência e critérios reconhecidos em uma determinada área geográfica, garantindo características exclusivas ao produto. O AOC protege essa designação tanto em território francês como o nome do produto em toda a União Europeia (INAO,2016).

Além deste país, Portugal, Espanha, Itália, Suíça e Holanda são outras nações que têm instrumentos legais de registro e controle de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru.

Entretanto, o Brasil, somente no fim da década de 1990 despertou para a necessidade da legalização dos queijos artesanais, devido às vendas expressivas destes produtos por canais informais. Principalmente na economia mineira, esse comércio informal vem transpondo as fronteiras do Estado para outras regiões do País, sem garantia de segurança do alimento. Assim, o Brasil, nos últimos anos, vem presenciando uma revolução relacionada tanto à criação como a modificações na legislação envolvendo queijos artesanais fabricados com leite cru (PINTO, 2008).

Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos, a legislação federal, mesmo na sua publicação mais recente (Instrução Normativa 30 de 07 de Agosto de 2013) é bastante inespecífica, além de colocar grande parte da responsabilidade sobre regulamentações complementares sobre os Serviços de Inspeção dos diversos estados do País.

Um exemplo disto, está no Artigo 1^o, Parágrafo 1^o:

“A definição de novo período de maturação dos queijos artesanais será realizada após a avaliação dos estudos pelo órgão estadual e/ou municipal de inspeção industrial e sanitária reconhecidos pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal- SISBI/POA” (BRASIL, 2013).

Essa necessidade de regulamentação complementar a ser realizada pelos estados e municípios se deve à grande diversidade na produção de queijos em todo o País. Entretanto, padrões de qualidade e segurança mínimos deveriam ser estabelecidos para os diversos tipos de queijos.

O Estado de Minas Gerais está na vanguarda no que se refere à regulamentação dos queijos artesanais, inclusive servindo de exemplo e motivação para que pequenos produtores de outros Estados se articulem quanto às necessidades de certificação.

Exemplo disso é a Lei Estadual nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, que segundo o Governo do Estado, valoriza os produtores, e cria regras para a expansão do agronegócio familiar, sem se descuidar dos aspectos sanitários envolvidos na produção. Para finalidades desta Lei, é considerado QMA o queijo que

apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem.

Apesar de ser anterior a Legislação Federal, toda a Legislação do estado de Minas Gerais já dispõe sobre questões tratadas na IN 30 do MAPA, demonstrando a importância do QMA na cultura e na economia de Minas Gerais.

2.2.1 – O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO QMA E REQUISITOS PARA SUA QUALIDADE E SEGURANÇA

São condições para a produção dos QMA, visando assegurar a qualidade e a inocuidade dos produtos, a produção do queijo com leite proveniente de rebanho sadio, que não apresente sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses, tais como brucelose e tuberculose, apresentem resultados negativos. Adicionalmente, deve atender às condições de higiene recomendadas pelo órgão de controle sanitário competente, neste caso o IMA (MINAS GERAIS, 2012).

A legislação ainda estabelece normas sobre condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do QMA. Dentre os principais aspectos estabelecidos pela legislação estão limpeza e desinfecção adequadas, obrigatoriedade de utilização de roupas adequadas. Além disto, o proprietário da queijaria artesanal deverá tomar providências para que todas as pessoas que manipulem alimentos recebam instrução adequada sobre matéria higiênico-sanitária e pessoal, com o objetivo de evitar a contaminação dos alimentos.

O processo de produção do QMA compreende as seguintes fases:

- I - Filtração do leite;
- II - Adição de cultura láctica e coalho;
- III - Coagulação;

IV - Corte da coalhada;

V - Mexedura;

VI - Dessoragem;

VII - Enformagem;

VIII - Prensagem manual;

IX - Salga seca;

X - Maturação.

A produção deve ser iniciada até noventa minutos após o começo da ordenha e o leite a ser utilizado não poderá sofrer tratamento térmico. Como complemento, utiliza-se culturas lácticas naturais, como o soro fermento, conhecido vulgarmente como “pingo”, não sendo permitido o uso da rala (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.1.1 Estrutura Física da Queijaria

Para os fins da legislação, considera-se queijaria o estabelecimento destinado à produção de queijo artesanal localizado em propriedade rural. Estruturalmente devem dispor basicamente dos seguintes ambientes: área para recepção e armazenagem do leite, área de fabricação, área de maturação e (se necessário) área de embalagem/expedição (MINAS GERAIS, 2012). Essas instalações deverão ser projetadas de maneira que seu fluxo de operações possa ser realizado em condições higiênicas, desde a chegada da matéria-prima, durante o processo de produção, até a obtenção do produto final. As queijarias deverão se situar em zonas isentas de odores indesejáveis, fumaça, pó e outros contaminadores e não deverão estar expostas a inundações. Se as queijarias forem contíguas ao curral onde se efetua a ordenha ou trato dos animais, deverá haver um local apropriado para higiene pessoal e troca de roupas (MINAS GERAIS 2002e).

Nas áreas de manipulação de alimentos, os pisos deverão ser de material resistente ao trânsito, impermeáveis, laváveis e antiderrapantes, sem frestas e fáceis

de limpar ou desinfetar. Os líquidos deverão escorrer até os ralos sifonados, impedindo a formação de poças e refluxo de água (MINAS GERAIS 2002e).

Considerando ainda as exigências sanitárias como localização distante de pocilga e galinheiro, inexistência de comunicação direta entre o estábulo e a queijaria e impedimento, por meio de cerca, do acesso de animais e de pessoas estranhas à produção. Finalmente, as paredes da alvenaria devem ser impermeabilizadas com pelo menos tintas laváveis e cores claras, pintadas até altura não inferior a dois metros, portas e janelas, dotadas de telas à prova de insetos e roedores, com o piso impermeável e antiderrapante (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.1.2. Equipamentos e Utensílios

A queijaria ainda deverá dispor dos seguintes materiais e equipamentos em aço inox ou outro material aprovado pelo IMA: tanques de recepção, de coagulação e com torneira de água corrente, cuja finalidade é a limpeza de utensílios, cubas e recipientes de plástico ou fibra de vidro; coadores e filtros de aço inox ou plástico de alta resistência; formas do queijo, que deverão ser de plástico e ter formato cilíndrico e tamanho de acordo com a tradição regional para a produção do QMA; prateleiras para maturação dos queijos, que poderão ser constituídas de madeira, plástico ou outro material aprovado pelo IMA. (MINAS GERAIS 2002e).

Os utensílios deverão estar em perfeito acabamento com superfícies lisas e planas, sem cantos vivos, frestas, juntas, poros e soldas salientes (MINAS GERAIS 2002e).

Após o término da fabricação, todos os utensílios utilizados deverão ser cuidadosamente limpos com solução detergente, acompanhando a orientação de uso do fabricante, seguido de higienização com solução desinfetante, recomendando-se solução de hipoclorito de sódio com 100 a 200 mg/L de cloro livre com trinta minutos de exposição (MINAS GERAIS 2002f).

2.2.1.3. Água

A queijaria deverá dispor de água para limpeza e higienização de suas instalações na proporção de cinco litros de água para cada litro de leite processado.

A água utilizada na produção dos queijos artesanais deverá ser potável, proveniente de nascente, de cisterna revestida e protegida do meio exterior ou de poço artesiano e canalizada desde a fonte até a caixa d'água da queijaria. Adicionalmente, deverá ser tratada por sistema de filtração e cloração; acondicionada em caixa d'água tampada, construída com material sanitariamente adequado (MINAS GERAIS, 2012).

As nascentes deverão ser protegidas do acesso de animais e livres de contaminação por água de enxurrada e outros agentes. A água utilizada na produção dos queijos artesanais será submetida às análises físico-químicas e bacteriológicas, em periodicidade a ser definida em regulamento (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.1.3. Leite

O leite empregado na produção dos queijos artesanais deve provir da propriedade ou posse rural em que está a queijaria.

Em situações de assentamento familiar ou agrupamento de produtores, a critério do órgão de controle sanitário, admite-se o compartilhamento da queijaria para o processamento de leite produzido em outras propriedades, desde que o responsável pela queijaria assuma a responsabilidade pela qualidade do leite processado e do queijo artesanal produzido (MINAS GERAIS, 2012).

Qualquer alteração no estado de saúde dos animais, capaz de modificar a qualidade sanitária do leite, constatada durante ou após a ordenha, implicará na condenação imediata desse leite e do conjunto a ele misturado.

2.2.1.4. Embalagem

Os queijos artesanais ostentarão na peça ou em sua embalagem o nome do seu tipo ou da sua variedade, o número do cadastro, do registro ou do título de relacionamento e o nome do Município de origem (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.1.5. Transporte

O transporte dos queijos artesanais será realizado em veículo com carroceria fechada. O acondicionamento para transporte do queijo artesanal não embalado será realizado em caixa ou tubo plástico, de fibra de vidro ou similar, com tampa ou vedação e de uso exclusivo para o produto (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.1.6. Fiscalização

A inspeção e a fiscalização industrial e sanitária da produção dos queijos artesanais são realizadas periodicamente pelo órgão de controle sanitário, visando assegurar o cumprimento das exigências da legislação. São realizados regularmente, a expensas do produtor, exames laboratoriais de rotina para atestar a qualidade do produto final, com frequência determinada pelo IMA (MINAS GERAIS, 2012).

Constatada a não conformidade nos exames de rotina, o órgão de controle sanitário competente poderá exigir novos exames a expensas do produtor, sem prejuízo de outras ações cabíveis (MINAS GERAIS, 2012).

2.2.2 - CONTROLE SANITÁRIO

2.2.2.1 - Vacinações

É obrigatória a vacinação contra a febre aftosa de todos os bovinos e bubalinos a partir de um dia de vida, a vacinação contra a raiva dos herbívoros de todos os bovinos, bubalinos e equídeos a partir dos três meses de idade, uma vez ao ano. Também será obrigatória para propriedades produtoras de QMA a vacinação contra a brucelose de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina entre 3 e 8 meses de idade (IMA, 2002c).

2.2.2.2 - Diagnóstico

Os testes de diagnóstico obrigatórios para propriedades produtoras de QMA são:

1) Sorológico para brucelose será realizados em fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses e machos com idade superior a 8 meses;

2) Diagnóstico indireto da tuberculose através de testes alérgicos de tuberculinização intradérmica em bovinos e bubalinos, com idade igual ou superior a seis semanas.

O produtor cadastrado deverá realizar anualmente testes do rebanho para diagnóstico de brucelose e tuberculose e encaminhar ao Escritório Seccional do IMA na região cópia do exame, assinado por médico veterinário cadastrado.

Além disto, todos os animais em lactação deverão ser submetidos, diariamente, ao teste de caneca telada ou de fundo escuro, visando ao diagnóstico da mamite. Os animais que apresentarem reação positiva deverão ser afastados da linha de ordenha, para tratamento (MINAS GERAIS 2002d).

2.2.2.3 - Tratamento Dos Animais

Nos casos de aplicações de medicamentos, os animais tratados somente poderão ter seu leite destinado à alimentação humana após a completa eliminação fisiológica dos resíduos. O período de carência dos produtos utilizados no tratamento dos animais deve ser observado e as recomendações do médico veterinário rigorosamente seguidas, para garantir a ausência de resíduos no leite e a segurança do consumidor (MINAS GERAIS 2002d).

2.3 – MICOPATIAS ATÍPICAS (MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS) E OUTROS ACTINOMICETOS

Actinomycetales ou comumente chamado de Actinomicetos é uma vasta ordem de bactérias pleomórficas gram-positivas, que formam filamentos como as micelas de fungos, característica de origem de sua nomenclatura, geralmente aeróbicas, bacilares e imóveis. Estão incluídos na ordem Actinomicetos os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* e *Tsukamurella*.

2.3.1 – CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

As Micobactérias são classificadas taxonomicamente na ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, onde figura exclusivamente o gênero *Mycobacterium* (LEÃO et al., 2004).

Micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em forma de bastão, aeróbios, imóveis, não-formadores de esporos, com tamanho variável entre as espécies, apresentando a álcool-ácido resistência como a característica mais importante do gênero (QUINN et al., 2005).

A classificação das micobactérias teve início em 1896, quando os pesquisadores Lehmann e Neumann propuseram o gênero *Mycobacterium* (LEÃO et al., 2004).

Durante muitos anos apenas *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae* foram reconhecidos como patógenos de humanos, até que Pinner, em 1935, designou o termo “micro-organismos álcool-ácido resistentes atípicos” aos isolados que se assemelhavam a *M. tuberculosis* com a identificação do primeiro caso de infecção por *M. fortuitum*. Desde então, vem surgindo na literatura uma série de relatos de infecções humanas e animais por micobactérias não tuberculosas (MNT). Tais descrições motivaram a seleção de testes bioquímicos, técnicas e estratégias de classificação mais completas para as micobactérias (LEÃO et al., 2004). Atualmente o gênero *Mycobacterium* é composto por 165 espécies e 13 subespécies (TORTOLI, 2006).

Runyon (1959), propôs uma classificação das MNT em quatro grupos baseados na pigmentação e tempo de crescimento das colônias. As espécies que apresentam crescimento em meio sólido após sete dias são classificadas como micobactérias de crescimento lento (MCL) e aquelas que apresentam crescimento em menos de sete dias, micobactérias de crescimento rápido (MCR). Em relação à produção de pigmentação, essas bactérias podem ser divididas em três grupos: acromógenas, fotocromógenas e escotocromógenas. Estas características associadas (tempo de crescimento e pigmentação) possibilitam a classificação das micobactérias em quatro grupos, chamados grupos de Runyon: I, II, III e IV (Tabela 1). Essa classificação é, ainda, utilizada para identificação das MNT juntamente com outros testes (BRASIL, 2008).

Tabela 1: Classificação das micobactérias de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento

Grupos	Pigmentação	Tempo de Crescimento
Grupo I	Fotocromógenas (colônias adquirem pigmentação quando expostas à luz)	Lento
Grupo II	Escotocromógenas (colônias produzem pigmentação mesmo quando crescem na ausência de luz)	Lento
Grupo III	Acromógenas (não apresentam pigmentação)	Lento
Grupo IV	Produtoras ou não de pigmento	Rápido

FONTE: RUNYON, 1959

As micobactérias também podem ser divididas em três grupos com base na significância clínica das infecções (LEÃO et al., 2004; VAEREWIJCK, 2006). O primeiro grupo compreende patógenos obrigatórios de humanos e animais, o denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, “*M. canettii*”, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* e *M. orygis* (VAEREWIJCK, 2006). O segundo grupo envolve micobactérias que são potencialmente patogênicas para humanos e animais, como os micro-organismos do Complexo *M. avium* (*M. avium subsp. avium*, *M. intracellulare*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. avium subsp. silvaticum*, *M. avium subsp. hominissuis*, *M. chimaera*, *M. colombiense*) [BEN SALAH et al., 2008]. O terceiro grupo consiste de espécies de vida livre, “não patogênicas” ou “ocasionalmente patogênicas”

(VAEREWIJCK, 2006). São exemplos deste terceiro grupo as micobactérias dos complexos *M. flavescens*, *M. smegmatis*, *M. shimoidei*, *M. alchiense*, *M. tokaiense*, *M. vaccae*, entre outras.

As bactérias do segundo e do terceiro grupo são comumente referidas como micobactérias “atípicas”, “anônimas”, ou MNT (VAEREWIJCK, 2006)

Tabela 2: Classificação das Micobactérias de acordo com a patogenicidade

Patogênicas	Potencialmente Patogênicas	Raramente Patogênicas
<i>M. leprae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. microti</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. branderi</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. avium subsp paratuberculosis</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i>	<i>M. agri</i> , <i>M. cooki</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. alchiense</i> , <i>M. diernhofer</i> , <i>M. hassiacum</i> , <i>M. porcinum</i> , <i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. alvei</i> , <i>M. duvalii</i> , <i>M. homossenz</i> , e <i>M. pulveris</i> , <i>M. tokaiense</i> , <i>M. brumae</i> , <i>M. fala</i> , <i>M. lepraemurium</i> , <i>M. rhodesiae</i> , <i>M. triviale</i> , <i>M. austroafricanum</i> , <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. senegalense</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. chitae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. shimoidei</i> , <i>M. gilvum</i> , <i>M. chubuense</i> , <i>M. gadium</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. aurum</i> , <i>M. confluentes</i> , <i>M. gastris</i>

M. obuense, *M.*
Novocastrense,
M. sphagni

FONTE: BRASIL, 2008.

As MNT estão amplamente distribuídas no meio ambiente, tendo sido isoladas nos alimentos, água, solo, animais, equipamentos cirúrgicos e, inclusive em soluções desinfetantes. A infecção ocorre por inalação, inoculação ou ingestão de material contaminado por micobactérias, podendo causar doenças pulmonares e infecções de feridas cirúrgicas em diferentes tecidos, porém, segundo alguns autores parece não ocorrer a transmissão de pessoa a pessoa (COWMAN et al., 2012; GÓMEZ, 2009).

2.3.2 – MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Classifica-se atualmente como micobactérias de crescimento rápido (MCR) as espécies pertencentes aos complexos:

1. *Mycobacterium fortuitum* que inclui: *M. fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, variantes de *M. fortuitum* (*M. houstonense*, *M. bonickei*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum* e *M. senegalense*);
2. *Mycobacterium chelonae-abscessus*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. immunogenum* e *M. massiliense*;
3. *Mycobacterium smegmatis*, cujos componentes são *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi*. (PITOMBO, 2009).

As MCR formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias quando incubadas em meio sólido diferentemente daquelas de crescimento lento como *M. tuberculosis* e *M. avium*, as quais o fazem após 7 a 30 dias de incubação. A maioria das espécies de MCR cresce em meios de cultura bacteriológicos simples contendo aminoácidos, glicerol e sais minerais (PITOMBO, 2009).

As infecções de pele e subcutâneo causadas por MCR se apresentam, em geral como abscessos piogênicos, com reação inflamatória aguda e supuração.

Podem evoluir lentamente, com inflamação crônica, formação de nódulos, ulceração e fistulização. Frequentemente a evolução é crônica e progressiva e a falta de resposta a antibióticos indicados a patógenos habituais de pele, indica a suspeita da infecção (BRASIL, 2007).

A identificação das MCR é importante para estabelecer a terapêutica adequada, visto que possuem diferentes padrões de resistência às drogas. A literatura refere que essas micobactérias são ambientais, mas patogênicas. Comumente, encontram-se no solo, lagos e água tratada, sendo possível infectar utensílios médicos e causar doenças pulmonares, infecções de feridas cirúrgicas, doenças de pele e de tecidos (RUNYON 1959).

No Brasil, há relatos de infecção por essas espécies de micobactérias em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos tais como cirurgias (BRASIL, 2007a).

Alguns estudos descreveram uma possível resistência das MCR ao processo de cloração, o qual é utilizado para tratamento de água de piscinas ou de consumo, e tratamento com glutaraldeído (GA), cloreto de benzalcônio, compostos organomercuriais, clorexidina e até mesmo autoclavação. A ubiquidade dessas espécies em ambientes úmidos contribui para que as MCR, especialmente *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*, sejam as espécies mais prevalentes em infecções em seres humanos relacionadas com exposição de sítios estéreis a fontes de água contaminadas ou com a infusão de soluções aquosas, sendo inexistentes os relatos indicando transmissão horizontal direta (PITOMBO.,2009).

2.3.3 OUTROS ACTINOMICETOS

Os gêneros como *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella* são actinomicetos gram positivos, aeróbios estritos e parcialmente ácido-álcool resistentes. *Nocardia* e *Rhodococcus* pertencem à família Nocardiaceae, ao passo que *Gordonia* e *Tsukamurella* se incluem nas famílias Gordoniaceae e Tsukamurellaceae, respectivamente (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

Embora sejam citoquimicamente gram positivos, os Actinomicetos parcialmente ácido-álcool resistentes não se coram pelo método de Gram, devido a

sua espessa composição da parede celular, que pode representar 40% do peso seco das bactérias. Tais características tornam estas bactérias hidrófobas e resistentes às condições adversas do meio ambiente e aos produtos químicos (QUINN et al. 2005), principalmente frente aos desinfetantes ácidos ou alcalinos. São, inclusive, menos afetadas pelo pH exigido para elaboração dos diversos tipos de queijos se comparada a outros patógenos do leite (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Nocardia* são gram positivos (muitas vezes com aspecto de colar de contas), de ácido-álcool de resistência variável, produtores de catalase e aeróbios estritos. À medida que crescem, as espécies de *Nocardia* formam filamentos ramificados que se estende ao longo da superfície do agar ou para o ar, estruturas que são denominadas hifas do ou hifas aéreas, respectivamente. Quando os microrganismos envelhecem, as *Nocardias* se fragmentam em bacilos pleomorfos ou elementos cocóides. As *Nocardias* também se caracterizam pela presença de ácido mesodiaminopimérico (DAP) e a presença dos açúcares arabinose e galactose no peptídeoglicano da sua parede celular (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

Na atualidade a taxonomia do gênero *Nocardia* se encontra sujeita a mudanças constantes e o reconhecimento e a descrição de espécies novas seguem sendo objeto de controvérsias quanto ao número de espécies validadas descritas. Em publicações recentes são citadas de 22 a 30 espécies válidas. É importante mencionar que a espécie identificada com mais frequência mediante o emprego de sequenciamento parcial de DNA-16S rRNA foi *Nocardia cyriacigeorgica*, seguida por *N. farcinica*, *N. nova*, *N. africana* e *N. veterana*. *N. asteroides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis* e *N. transvalensis*. são as espécies que com mais frequência causam enfermidades nos seres humanos (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

Os microrganismos que pertencem aos gêneros *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella* são similares às espécies de *Nocardia* no sentido de que são bactérias gram positivas, aeróbicas, produtoras de catalase, parcialmente ácido-álcool resistentes, ramificadas e filamentosas que podem fragmentar-se em bacilos e cocos. A magnitude da resistência ácido-álcool depende da quantidade e da complexidade dos ácidos micólicos presentes na parede celular do microrganismo e as condições de cultivo (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009). Ácidos micólicos são

raros ácidos graxos de cadeia longa, com 40 a 90 átomos de carbono (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

A diferenciação entre *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella* é difícil, bem como a identificação da espécie. Em particular, o gênero *Rhodococcus* consiste em um grupo de microrganismos muito heterogêneo no que se referem à morfologia, características bioquímicas e capacidade de causar enfermidades. Como já foi mencionada, a taxonomia desses microrganismos continua em evolução. As principais espécies incluídas no gênero *Rhodococcus* são *R. equi*, *R. erythropolis* e *R. rhodochorus*; as de *Gordonia* são *G. aichiensis*, *G. bronchialis*, *G. poluisoprenivorans*, *G. rubripertincta*, *G. sputi* e *G. terrae*; as de *Tsukamurella* são *T. paurometabola*, *T. pulmonis*, *T. ichonensis*, *T. tyrosinosolvans* e *T. strandjordae* (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

Até o momento, *Rhodococcus equi* tem sido o microrganismo associado com maior frequência com enfermidades humanas, em particular em pacientes imunodeprimidos, como os infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). *R. equi* é um microrganismo intracelular facultativo, que pode persistir e reproduzir dentro de macrófagos. Ainda está se investigando outros possíveis determinantes da virulência de *R. equi*, entre eles a presença de ácido micólico e a parede celular que pode participar na sobrevivência intracelular, a produção de interleucina 4 e a formação de granuloma. Embora as espécies de *Gordonia* e *Tsukamurella* possam causar infecções oportunistas em seres humanos, pouco se sabe a respeito de sua patogenicidade. (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

2.3.4 - EMPIDEMIOLOGIA

2.3.4.1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS MNT

Ao contrário das espécies do complexo *M. tuberculosis*, as MNT apresentam patogenicidade variável (ZAMARIOLI et al., 2008). A capacidade das MNT em causar doença está claramente documentada na literatura, sendo que os primeiros quadros clínicos foram descritos na década de 1950 e por muitos anos foram considerados ocasionais e quase sempre ligados a situações de imunodeficiência.

Atualmente, mesmo com a alta prevalência de tuberculose, o estudo das MNT vem despertando interesse, sobretudo devido ao aumento da detecção de MNT em indivíduos com HIV ou que se submeteram a procedimentos cirúrgicos. Por não serem transmissíveis, as doenças causadas pelas MNT não são de notificação obrigatória, a não ser em casos de infecção após procedimentos cirúrgicos realizados em serviços de saúde, onde tenham sido detectadas MCR (LIMA, 2014). Como geralmente as MNT não são de notificação obrigatória, a ocorrência desses agravos é subnotificada.

As MNT assumem um papel importante como infecção oportunista em pacientes com história de imunossupressão, sobretudo a provocada pelo vírus HIV. A prevalência das infecções por MNT aumentou consideravelmente com o avanço da pandemia da infecção por HIV/Aids e/ou introdução de terapias imunossupressoras (FALKINHAM , 1996).

Com o advento da infecção por HIV/Aids, houve uma mudança nas manifestações das MNT de doença predominantemente respiratória para infecções disseminadas, além de aumento do número de casos. Nos Estados Unidos e Europa, entre 25 a 50% dos portadores do HIV apresentam coinfeção com MNT. Tais evidências motivaram novas investigações sobre possíveis fontes e rotas de infecção por estas bactérias (FALKINHAM , 1996), entre elas possíveis ciclos de transmissão zoonóticos.

A distribuição das MNT é global, porém essa distribuição não é homogênea em todo planeta. Em regiões onde a tuberculose é comum, apenas uma pequena minoria dos casos de micobacteriose pulmonar será causada por MNT. Por outro lado, em regiões onde a tuberculose é rara, tais como zonas rurais da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, uma proporção muito maior de micobacteriose pulmonar é causada por MNT (LOACHIMESCU,2010).

Existem variações geográficas na distribuição das espécies de MNT: enquanto que o complexo *M. avium* ocorre em todo o mundo, outros, tais como *M. xenopi*, *M. ulcerans* e *M. malmoense*, estão restritos a determinadas regiões (LOACHIMESCU,2010).

M. xenopi, por exemplo, é o segundo organismo causador de micobacteriose mais comum no Canadá e no Reino Unido, assim como *M. malmoense* é a segunda causa mais comum de micobacteriose na Suécia e em

outros países do norte da Europa. Já na Austrália e países tropicais da Ásia *M. Ulcerans* se destaca como a principal fonte causadora deste tipo de enfermidade.

Embora o complexo *M. avium* tenha uma distribuição mundial disseminada, é raramente isolado de pessoas soropositivas da África central (LOACHIMESCU,2010). Uma explicação possível para este fato é que aqueles que têm HIV na África podem morrer de infecção por patógenos mais agressivos como *M. tuberculosis* antes de sua imunossupressão tornar-se grave o suficiente para desenvolver problemas pulmonares causados por MNT. Além disso, a distribuição de espécies varia com o tempo, possivelmente como resultado de mudanças ambientais (LOACHIMESCU,2010).

Em estudo realizado por Barreto e Campos (2000) utilizando 590 isolados de micobactérias de pacientes humanos diagnosticados com infecções causadas por MNT obtidas de diferentes regiões brasileiras durante o período de 1994 a 1999 foi observada uma preponderância de *M avium-intracellulare* (44,4%), seguido de *M. kansasii* (13,7%) e *M. fortuitum* (10,8%). Em relação aos casos confirmados de micobacterioses por região brasileira demonstrou-se uma maior participação das regiões Sudeste e Sul, juntas responsáveis por 57,6% do total de casos no país, sendo 17,86%,16,4% e 8,12%, provenientes do Centro Oeste, Nordeste e Norte, respectivamente. Dentre os 431 pacientes estudados, 106 foram considerados casos de micobacteriose, sendo a forma mais frequente a pulmonar (60,3%). Embora seja elevado o número de casos notificados de infecção por MCR entre as espécies potencialmente patogênicas, as pertencentes ao complexo *M. avium* e *M. kansasii* são as mais comumente isoladas, as quais causam principalmente infecção pulmonar. Por outro lado, o complexo *M. avium* é frequentemente responsável por causar doença disseminada e óbito em pacientes com Aids (UEKI, 2005).

No período de 2000 a 2008, foi realizado um levantamento epidemiológico, onde se verificou que foram notificados no Brasil, 2.139 casos de infecção por MCR de diversas causas, em 22 estados mais o Distrito Federal, com destaque para os estados do Rio de Janeiro (1.105 casos), Pará (321 casos), e Espírito Santo (293 casos) (RENISS, 2009).

O agente etiológico prevalente na maioria das cidades brasileiras foi *M. massiliense*, exceto nas infecções secundárias a mamoplastias de aumento, nas quais a maior prevalência foi de *M. fortuitum*. Outras espécies de MCR foram

identificadas como *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* e *M. wolinskyi* (ANVISA, 2009).

2.3.4.2 - FONTES DE INFECÇÃO E MODOS DE TRANSMISSÃO DAS MNT E OUTROS ACTINOMICETOS PARA SERES HUMANOS

Apesar da comprovação de que as MNT podem ser transmitidas por diversas vias, e publicações terem apontado diversas evidências relacionadas à ingestão de alimentos em geral, a importância da presença destes patógenos em amostras de produtos lácteos precisa ser melhor estudada. A necessidade de se conhecer melhor as fontes de infecção e rotas de transmissão das MNT aos seres humanos, justifica-se porque as infecções do grupo de MNT causam morbidade e mortalidade principalmente em pessoas que possuem o sistema imunológico comprometido (YODER et al., 1999; KONUK et al., 2007).

Hruska e Kaevska (2010) publicaram uma revisão analisando tipo de alimento envolvido no isolamento de MNT. Verificou-se uma predominância de isolamentos do referido grupo de micobactérias em leite e queijos, comparado às outras classes de alimentos estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Trabalhos publicados sobre Micobactérias não Tuberculosas em alimentos.

ALIMENTO	TOTAL DE TRABALHOS PUBLICADOS	TRABALHOS PUBLICADO (2006-2010)
Leite	626	307
Peixes	381	151
Carne	98	45
Frutas	65	39
Queijos	37	20
Vegetais (Exceto Frutas)	11	6

Fonte: HRUSKA,2010

Os relatos de isolamento de micobactérias em leite têm sido frequentes. Appuswami et al. (1980) isolaram micobactérias em 4,3% dentre 209 amostras de leite coletadas em fazendas e no comércio indiano. Já Guindi et al. (1980) obtiveram, a partir de 543 amostras de tanques de resfriamento, 16 (2,94%) isolamentos de *M. bovis* e oito (1,47%) de *M. tuberculosis*. Em Cuba, outro estudo identificou micobactérias saprófitas em 13% de 285 amostras de leite (SANCHEZ e ROSELL, 1983). Kazwala et al. (1998) descreveram 3,9% de positividade de micobactérias a partir de 805 amostras de leite analisadas na Tanzânia, dos quais dois isolados de *M. bovis*, além de *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. gordonae* e *M. smegmatis*.

Em 2005, foi relatado um surto humano por *M. fortuitum* a partir do consumo de leite *in natura* de uma vaca de 7 anos, que apresentava mastite pelo agente em questão. O consumo do leite proveniente a uma pequena propriedade rural do sudoeste da Irlanda levou ao desenvolvimento de um caso de Doença latente em uma criança de 7 anos e de doença ativa em outra criança de 4 anos, que teve teste de *Montoux* positivo e aumento de dois linfonodos cervicais (DORAN et al. 2009).

Também no Brasil o número pesquisas relacionadas ao isolamento de *Mycobacterium spp.* em alimentos vem crescendo nos últimos anos.

FRANCO (2012), isolou 14 espécies diferentes do gênero *Mycobacterium* em 24 (8%) das 300 amostras de leite informal obtidas em tanques de expansão localizados no estado de São Paulo. Os isolados pertencem ao grupo das MNT (*M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalli*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* e *M. vaccae*). A espécie mais frequentemente encontrada foi *M. gordonae*, em seus tipos 1, 2 e 9.

Em pesquisa realizada também na cidade de São Paulo, MORICONI (2009), analisaram 133 amostras de Queijo Minas meia Cura nas feiras livres do município e 22 apresentaram colônias (37 isolados) que foram submetidas a identificação molecular. Do total de isolados, 26 (70,27%) foram caracterizados como *Mycobacterium spp.*

Em outro estudo, FARIA et al. (2014) detectou *M. avium* subspécie *paratuberculosis* em 03 (10%) das 30 amostras de queijo coalho artesanal, obtidas na região de Parnaíba no estado do Piauí.

JORGE (2011) realizou um estudo no estado do Mato Grosso do Sul utilizando rebanho Holandês diagnosticado clinicamente com tuberculose, isolando 44,4% de micobactérias (incluindo 33,3% de *M. bovis*) em amostras de leite de vacas aparentemente saudáveis, sustentando a premissa de que este alimento pode representar importante fonte de transmissão de micobactérias para o próprio rebanho, outros animais domésticos e para o ser humano. Porém, quando essa avaliação foi realizada em rebanho sem diagnóstico clínico da doença, esse percentual foi drasticamente reduzido para 4,3 % de positividade (LEITE, 2003), reforçando a ideia de que a presença de micobactérias tuberculosas em produtos lácteos depende de diversas variáveis, como a prevalência da doença no rebanho e a taxa de excreção dos referidos microrganismos dentro dos rebanhos positivos. Acredita-se que a liberação de MNT pelo leite também possa ser maior em rebanhos positivos e seja diretamente proporcional à taxa de positividade em cada rebanho.

Além da excreção pela glândula mamária, existem outras maneiras de contaminação do leite e dos derivados lácteos por MNT. A contaminação exógena pode ocorrer por meio de excreções dos bovinos infectados por meio de fezes, urina, secreções vaginais ou uterinas, pela contaminação pós-ordenha, durante o processo de manipulação ou transporte do produto e também por bacilos provenientes de equipamentos de ordenha sujos ou mal lavados (LEITE et. Al. 2003; ROXO,1997, ABRAHÃO,2005).

Com relação à presença de MNT em Leite e seus derivados lácteos no Brasil, a instabilidade do mercado de leite no País força os pequenos produtores a procurar alternativas para o comércio de sua produção, o que inclui a venda, sem fiscalização sanitária, de leite cru ou “leite informal”, para indivíduos que dão preferência a esse tipo de leite (NERO et al., 2004). Embora haja perspectiva de aumento na formalização do comércio do leite e seus derivados, este processo deverá ocorrer de forma lenta e gradual, expondo os consumidores a sérios riscos sanitários ainda por muitos anos.

Seguindo a mesma tendência da matéria prima, a produção e consumo de queijos produzidos a partir de leite *in natura* também é bastante alta no Brasil. Um estudo realizado em Minas Gerais em 1999, apontou que 92,9% dos queijos produzidos em 1600 propriedades rurais analisadas eram feitos com “leite cru” (BELCHIOR, 2001).

Adicionalmente, segundo dados do IMA (2015), apenas 10 % dos produtores de queijos artesanais (obtidos a partir de leite cru) são registrados ou cadastrados no órgão de inspeção do estado de MG. Esta constatação é preocupante, pois segundo a legislação brasileira “todos os produtos de origem animal, comestíveis e não comestíveis, adicionados ou não de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito estão sob a obrigatoriedade da prévia fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, incluindo dentre outros os animais destinados à matança, seus produtos e subprodutos e matérias primas” (BRASIL, 1950).

Finalmente, outros actinomicetos como *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* podem ser isolados de várias fontes ambientais, em especial do solo e animais de fazenda, assim como da água doce e salada. Considera-se que são transmitidos principalmente por inalação. Em sua maior parte estes actinomicetos aeróbicos são isolados com pouca frequência de amostras clínicas (FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2009).

3 - OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar a ocorrência de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro e avaliar seus possíveis impactos à saúde pública.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar a ocorrência de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro e avaliar seus possíveis impactos à saúde pública.

Avaliar possíveis impactos à saúde pública relacionados à presença de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro

4. MATERIAL E MÉTODOS

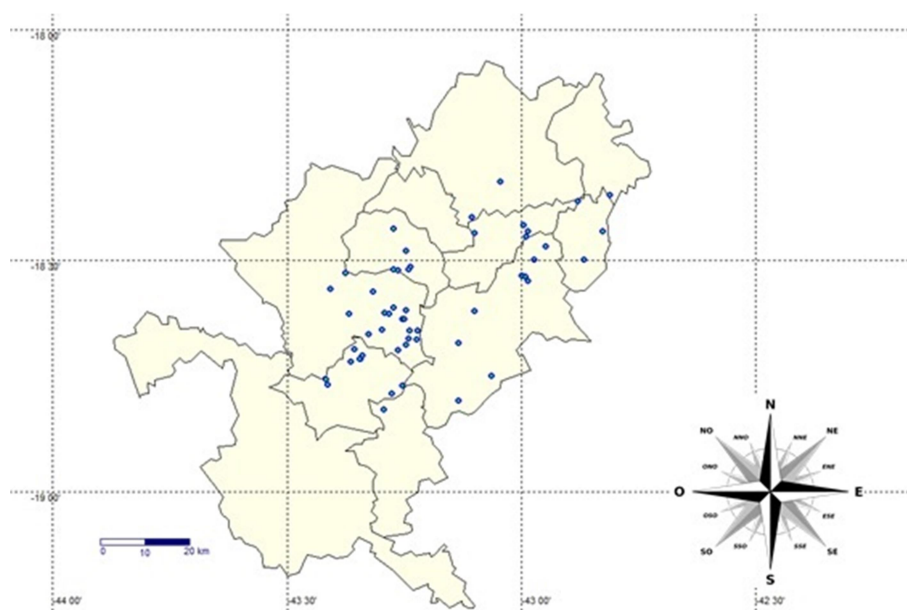
4.1. DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal para estimar a presença de *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos em propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro. Foi utilizado como critério para a inclusão dos produtores na amostra a certificação ou cadastro no IMA. As propriedades selecionadas foram distribuídas entre os 11 municípios pertencentes à Microrregião do Serro, sendo eles: Alvorada de Minas, Coluna, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Itambé do Mato Dentro, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Serra Azul de Minas, Serro (Figura 2).

4.2. PLANEJAMENTO AMOSTRAL

A amostra da população-alvo para estimar o percentual de propriedades positivas para *Mycobacterium bovis*, Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos foi determinada por meio de sorteio aleatório de 55 (44%) queijarias entre as 125 que no período das coletas constavam no sistema do IMA, sendo desse total 52 certificadas e 03 cadastradas no IMA. Em cada uma das propriedades sorteadas foi coletado um queijo, com tempo de maturação entre 4 e 8 dias, para representá-la (Figura 3). Foram realizadas coletas no período entre Junho e Dezembro de 2014.

Figura 3. Mapa da distribuição das propriedades selecionadas para as coletas, microrregião do Serro, Minas Gerais, 2014.



Fonte: Trackmaker – André Almeida Santos Duch.

4.3. COLETA DE DADOS SOBRE AS PROPRIEDADES E OS PRODUTORES

Os dados deste trabalho são oriundos da aplicação de uma entrevista, usando um questionário estruturado e resultados de análises laboratoriais, que, uma vez sistematizados, formam a base do trabalho.

Foram entrevistados 55 produtores. O questionário utilizado neste estudo possui questões organizadas por grupo de conteúdo, enfocando as características socioeconômicas das famílias dos produtores, e gerais da propriedade/rebanho, da sanidade do rebanho, da produção, da produtividade, das questões ambientais e das boas praticas de ordenha e produção.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS DE QUEIJO

Os queijos foram coletados por equipe do estudo capacitada para executar a coleta, acondicionamento, armazenamento e transporte de amostras.

As amostras continham aproximadamente 900 g, coletadas em suas embalagens próprias (Embalagem plástica termoencolhível). As amostras foram mantidas sob refrigeração (<4 °C) até o envio para o Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite. As amostras foram enviadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, em quantidade suficiente para garantir a manutenção das amostras a uma temperatura < 4 °C. No LQL, as amostras foram fracionadas em porções menores de 100 g, acondicionadas em bolsas estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB), lacradas, identificadas e enviadas ao Laboratório da Embrapa Gado de Corte. Para este envio, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável em quantidade suficiente para manter a temperatura < 4 °C até a chegada da amostra ao Laboratório de destino, onde foram realizadas as análises laboratoriais pertinentes: cultivo para micobactérias e posterior identificação molecular dos isolados.

4.5 - CULTIVO DE MICOBACTÉRIAS

No Laboratório da Embrapa Gado de Corte, as amostras de queijo foram homogeneizadas e posteriormente submetidas à descontaminação.

As amostras descontaminadas foram inoculadas em meios de cultivo Stonebrink, sendo determinados as características de cultivo e os perfis moleculares dos isolados.

4.6 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Os isolados bacterianos obtidos das amostras de QMA 46, 49, 53 e 54 foram submetidos à amplificação do DNA por PCR usando *primers* específicos Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCTGAACCGCATACCCT), para amplificação de um fragmento de 439 pares de bases do gene *heat shock protein - hsp65* (Talenti et al. 1993). Os produtos de PCR foram clonados em vetor plasmidial pGEMT-Easy (Promega) e sequenciados (Sanger et al., 1977), usando-se os *primers* SP6 Promoter Primer e T7 Promoter Primer (Promega). As sequências de nucleotídeos resultantes de cada isolado, obtidas com o programa Sequence Scanner (Applied Biosystems) foram submetidas aos procedimentos a seguir:

a) Alinhamento (*pairwise*) de todas as sequências obtidas a partir dos amplificadores de cada um dos isolados, usando a ferramenta de alinhamento de sequências de nucleotídeos “Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide” – BLASTn, otimizado para sequências altamente similares (MEGABLAST). Com esta ferramenta foram encontrados os trechos que se alinhavam segundo metodologia prévia estabelecida por Altschul et al. (1997)

b) Com o *script pickrc.pl* foram capturados apenas os trechos de interesse de cada arquivo de sequência de DNA: uma fita *forward* (F) e outra fita *reverse* (R) de cada isolado.

c) As sequências de nucleotídeos obtidas com os *primers* F e R de cada um dos três isolados foram usadas para gerar uma sequência consenso (em um mesmo arquivo) para cada isolado. Para esse procedimento foi usado o programa uGene MUSCLE, uma ferramenta de alinhamento múltipla, de acordo com metodologia estabelecida por Okonechnikov et al. (2012).

d) Após correção dos “gaps” nas sequências consenso de cada isolado, finalmente as mesmas foram, então, comparadas, desta vez usando a ferramenta BLASTn, otimizado para sequências altamente similares (MEGABLAST), contra a base “non-redundant nucleotide” (nr) do NCBI, não restringindo a busca para gênero ou espécie. Assim, definiu-se por fim a espécie de cada isolado pelo maior grau de similaridade apresentado.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

A prevalência da presença de amostras de campo de Micobactérias não tuberculosas e Actinomicetos detectadas por cultura bacteriana em queijos artesanais de propriedades da microrregião do Serro foi determinada. No cálculo estatístico, foi utilizado o programa Epiinfo para estimar o intervalo de confiança para uma proporção (p) com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Por se tratarem de propriedades cadastradas ou certificadas, todas foram submetidas ao teste de tuberculização intradérmica comparada, conforme disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), realizado por médico veterinário particular credenciado no programa, apresentando resultado negativo.

Quatro amostras apresentaram resultados positivos (7,27%) para microrganismos de crescimento rápido por meio de cultura bacteriana. Todas foram caracterizadas preliminarmente como MCR. Entre os isolados obtidos das quatro amostras de queijos, os provenientes das amostras 46, 49, 53 e 54 foram caracterizados por métodos moleculares (sequenciamento de DNA).

Não foram encontrados resultados positivos para *M. bovis*.

As sequências consensos de DNA dos isolados das amostras 46, 49, 53 e 54 são apresentadas a tabela 4:

Tabela 4 – Sequências consensos dos isolados das amostras 46, 49, 53 e 54.

Isolado	Sequência consenso de DNA
46	ACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCT GGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCA AGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTGCCGGCGA CGGCACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCGCTC GTGCGCGAGGGTCTGCGTAACGTCGCGGCCGGCGCCA ACCCGCTCGGCCTCAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGT CGAGAAGATCACCGAGACGCTGCTGAAGTCGGCCAAGG AGGTCGAGACCAAGGACCAGATCGCCGCCACCGCCGC GATCTCGGCCGGCGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCG CCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCATC ACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGA GCTCACCGAGGGTATGCGGTTTCGACAAG
49	CGCATACCCTCGGTGAGCTCGAGCTGGAGTCCGAAGGT GTTGGACTCCTCGACGGTGATGACGCCTAGACTTGCCG ACCTTGATCCATCGCCTCGGCGATAAGCTCGCCGATCG AGGGTTCGCCTGCCGAGATAACCAGCGGTCGCAGCGAT CTGCTCCTTGGTCTCGACCTCCTTGGCGCTCTTCAGCA GCGACTCGGTGACGGCTTCGACAGCCTGCTCGATGCCG CGCTTGAGGCCATCGGGTTGGCGCCTGCGGCCACGT TGCGCAGACCCTCGCGCACGAGTGCCTGAGCCAGAAC GGTTGCGGTGGTGGTGCCGTCGCCAGCGACGTCGTCA GTCTTCTTGGCGACCTCCTTGACGAGCTCGGCACCGAT CTTCTCGTACGGGTCCCTCCAGCTCGATCCCCTTGGCGA TGGACACACCATCGTTGGTAATC

53 GATTACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCG
AGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTC
GTCAAGGAGGTGCGCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGG
CGACGGCACCACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCAC
TCGTGCGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGCAGGCGC
CAACCCGATGGGCCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCT
GTCGAAGCCGTCACCGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAA
GGAGGTGCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCGACCGCT
GGTATCTCGGCAGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTTAT
CGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTC
ATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCT
CGAGCTCACCGAGGGTATGCGGTTTCGACAAG

54 GATTACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCG
AGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTC
GTCAAGGAGGTGCGCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGG
CGACGGCACCACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCAC
TCGTGCGTGAGGGCCTGCGCAACGTGCTGCAGGCGC
AAACCCGATGGGCCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCT
GTCGACGCAGTCACCGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAA
GGAGGTGCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCT
GGTATCTCGGCTGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTCAT
CGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTC
ATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCT
CGAGCTCACCGAGGGTATGCGGTTTCGACAAGAATCACT
AGTGAATTCGCGGC

A sequência das amostras 46, 49, 53 e 54 apresentaram maior similaridade com as espécies *Mycobacterium novocastrense*, *Gordonia bronchialis*, *Gordonia bronchiallis* e *Gordonia bronchiallis*, respectivamente, apresentando resultado 0 (Zero) de e-value no best hit.

A caracterização, o número de pares de base sequenciadas e pareadas, assim como a similaridade obtida são representadas na Tabela 5:

Tabela 5 – Caracterização, número de pares de bases sequenciados e pareados e similaridade das amostras positivas.

Amostra	Bases sequenciados (PB)	Bases pareados (PB)	Similaridade (%)	Espécie
40	441	430	98	<i>M. novocastrense</i>
49	436	412	94	<i>G. bronchialis</i>
53	445	424	95	<i>G. bronchialis</i>
54	445	431	97	<i>G. bronchialis</i>

FONTE: DO AUTOR, 2016.

6 - DISCUSSÃO

Apesar de somente três das quatro amostras terem sido identificadas como *Mycobacterium novocastrense* (n=1) e *Gordonia bronchiallis* (n=3), *Gordonia bronchiallis*) por meio das análises realizadas, a presença de actinomicetos de crescimento rápido foi confirmada em um total de 7,23% das amostras analisadas.

A cultura bacteriana é o método de referência e o teste definitivo para confirmação da presença de actinomicetos. Entretanto, este é um processo extremamente lento, que pode se prolongar por até dois ou três meses para sua conclusão. Além disso, a sensibilidade do cultivo não é 100%, podendo ocorrer culturas falso-negativas (ZANINI,1998). Outro fator que poderia diminuir as chances de isolamento bacteriano é a diluição que esses agentes bacterianos sofrem nos tanques de mistura ou mesmo devido à injúria da célula bacteriana durante o processo de fabricação do queijo, descontaminação da amostra para o cultivo, etc.

Neste contexto, as técnicas básicas para detecção de presença/ausência de patógenos em alimentos em geral incluem uma ou mais etapas de enriquecimento da amostra para tentar favorecer tanto a população do patógeno que pode estar abaixo do limite de detecção direta, assim como as células bacterianas injuriadas devidos aos processos tecnológicos (calor, refrigeração, alteração de pH, atividade de água, entre outros). Além disso, normalmente as amostras estão acompanhadas por alta carga de microrganismos competidores, que precisam ser inibidos para que a bactéria alvo tenha oportunidade de se multiplicar (SILVA et al.,2010). Mas, o próprio processo de descontaminação, necessário por um lado, também pode provocar injúrias nas células microbianas.

Os fatores citados associados à alta sensibilidade do microrganismo podem justificar o não isolamento do *M. bovis* no presente trabalho.

Sobre a técnica de identificação molecular utilizadas no presente trabalho, permite a identificação bacteriana através da análise da região funcional da sequência HSP65, presente em todas as bactérias. Possibilita a identificação a partir de um único par de iniciadores, independente de conhecimento prévio da espécie de microrganismo em estudo. O posterior sequenciamento do fragmento amplificado e análise de bioinformática contra um banco de dados (BLASTn) de sequências de DNA permitem a identificação bacteriana em gênero e espécie. Uma das vantagens desta técnica está na identificação bacteriana com um pequeno volume de amostra e o fato de não sofrer influência de variações fenotípicas dos microrganismos e reduzindo os erros laboratoriais. (CLOUD *et al* , 2002).

Além disso, o sequenciamento permite uma identificação mais precisa de bactérias pobremente descritas, raramente isoladas ou pertencentes a estirpes

aberrantes, comparativamente à identificação por testes fenotípicos, reduzindo os frequentes erros de identificação por esta última metodologia (CLARRIDGE, 2004).

A desvantagem está na de bases de dados públicas, como o GenBank cujas sequências depositadas não são revistas (“peer reviewed”), podendo qualquer utilizador depositar sequências de má qualidade com erros e ambiguidades, incompletas e com identificação insuficiente (BOUDEWIJNSET *et al* , 2006).

Até o presente momento não existem métodos laboratoriais validados que permitam a certificação de laticínios que não utilizam tratamento térmico em seus produtos como “livres de actinomicetos viáveis”. No entanto, conforme já descrito neste trabalho, estudos pontuais tem abordado a determinação de micobactérias e outros actinomicetos em amostras de leite.

A porcentagem de actinomicetos encontrados no presente estudo serve para estimular outras discussões e preocupações relacionadas à segurança do alimento e a questões de proteção do consumidor. A alta resistência ambiental dos gêneros *Mycobacterium* e *Gordonia* aliada à possibilidade de esses agentes provocarem doença crônica e portadores humanos assintomáticos por longos períodos, além da ecologia complexa dessas espécies ambientas, que possuem uma ampla gama de reservatórios, representam um grande desafio para um controle efetivo dos mesmos (PRIMM *et al.*, 2004).

A contaminação do leite cru por micobactérias e outros actinomicetos aparentemente é inevitável, apesar das boas práticas sanitárias, em face da gama de variedade de espécies e das próprias características destes microrganismos. Até o momento, o tratamento térmico do leite cru, usando os protocolos comerciais de pasteurização, é o único processo tecnológico conhecido que garante destruição adequada de micobactérias contaminantes (HOLSINGER *et al.*, 1997).

A transmissão de MNT aos humanos através do leite submetido à inativação térmica de microrganismos é improvável. Entretanto, o consumo do leite cru, bem como seus derivados, representa importante risco sanitário (HOLSINGER *et al.*, 1997).

Estudos em vários países têm enaltecido a preocupação com a presença de micobactérias em amostras de leite bovino, bem como defendido a viabilidade do cultivo microbiológico como método diagnóstico, tanto em amostras individuais como em tanques de expansão (HOLSINGER *et al.*, 1997).

Sobre os patógenos identificados neste trabalho, *M. novocastrense* foi isolado pela primeira vez por Shojaei et. Al (1997). Esta identificação aconteceu em uma amostra de biópsia feita a partir de um tecido de granulação que se espalhava lentamente na mão de uma criança que havia recebido seis semanas de terapia antituberculose. A estirpe isolada possuía propriedades consistentes para classificação no gênero *Mycobacterium* de crescimento rápido. Um sequenciamento genético completo do 16S rRNA da estirpe foi determinada após a clonagem e sequenciamento do gene. A sequência foi alinhada com aquelas de micobactérias específicas disponíveis e depositadas em bancos. Com base no seu padrão de ácidos micólicos e outras características fenotípicas únicas (como a capacidade para formar colônias pigmentadas amarelas quando incubadas à luz) foi prontamente distinguido das MCR descritas até então. O nome proposto para esse patógeno tem relação com a cidade onde a espécie foi descoberta, Newcastle, uma cidade ao norte da Inglaterra (SHOJAEI ET. AL 1997).

M. novocastrense é uma MCR, pigmentada, aeróbica e gram-positiva. Dentre suas características bioquímicas é considerada fracamente ácido-álcool-resistente, sem motilidade, fotocromogenicidade moderada, células em forma de bastonete com 3 a 4 µm de comprimento, com algumas formas filamentosas em culturas mais antigas. Crescimento amarelo pigmentado visível do inóculo diluído ocorre quando é incubado durante 3 a 7 dias à luz. Esta coloração amarela é mais profunda em culturas mais velhas (SHOJAEI ET. AL 1997).

A presença de *M. novocastrense* como causa de infecção em humanos já foi relatada na literatura relacionada tanto em pacientes aparentemente saudáveis como em imunossuprimidos. Shojaei et. al (2011) relatam dois casos com a presença de *M. novocastrense*, nos quais se demonstra a dificuldade e a importância do diagnóstico correto de MCR. No primeiro caso, uma mulher de 60 anos de idade, diagnosticada com HIV, foi encaminhada para um hospital por causa da febre alta, produtiva tosse, dor torácica e perceptível perda de peso. Na admissão, testes laboratoriais mostraram tuberculina negativa ao teste cutâneo, linfopenia, nível de proteína C-reativa elevada, sedimentação de eritrócitos, carga viral de 500 cópias/mL, e hemocultura negativa para o crescimento bacteriano. Seus registros ambulatoriais indicaram que nela empiricamente foram aplicadas várias drogas antimicrobianas por causa de um diagnóstico provisório de pneumonia bacteriana, mas não houve evolução. Motivada pelo agravamento de seus sintomas

e um diagnóstico de suspeita de tuberculose, foi recolhido fluido de lavagem bronquial. Um exame microscópico da espécime mostrou BAAR com subsequente formação de colônias típicas e fotocromogenicidade, além de crescimento rápido em meio Lowenstein-Jensen (LJ), gerando a suspeita de *Mycobacterium spp*. A paciente foi tratada com Amicacina e sua condição melhorou sensivelmente (SHOJAEI et. al 2011). No segundo caso citado, uma mulher de 23 anos de idade procurou atendimento com histórico de inchaço dos tecidos moles em sua perna esquerda, resultante de um acidente em um campo de arroz. A lesão não tinha sido tratada e aumentou em tamanho, formando um grande nódulo que, ao se romper, excretou pus amarelo-pálido. Foi prescrito minociclina por seu estado clínico geral, mas a lesão não regrediu. Quando a paciente voltou ao hospital, sua avaliação clínica e laboratorial foram normais. Ela teve resultados negativos para HIV, hepatite C, hepatite B e infecções. O resultado de uma cultura da biópsia da lesão cutânea foi negativo, embora a observação microscópica do fluido drenado apresentasse bacilos ácido-resistentes. Este resultado foi confirmado por uma cultura positiva em meio LJ. Realizado isolamento do mesmo organismo em cultura pura foi encontrada a mesma espécie. Foi administrado Amicacina ao paciente, que ficou totalmente recuperado em menos de 1 mês. (SHOJAEI et. al 2011). Os isolados descritos anteriormente foram submetidos à identificação molecular, por PCR. O sequenciamento parcial do gene 16S rDNA (1476 pb) e sequências parciais de *hsp65* e genes *rpoB* dos isolados mostraram a maior similaridade de 99,86%, 99,45%, e 99,7% com a de Micobactéria estirpe de referência *novocastrense*. Estes valores correspondem às diferenças de 2 nt para cada gene. Estes casos clínicos citados são provas da relevância clínica do *M. novocastrense*, que pode ser causa de infecção em pacientes saudáveis e imunocomprometidos, apesar de sua rara incidência.

Na amostra isolada (amostra 46) no presente estudo, foi feito sequenciamento de DNA (441 pares de base) da região *hsp65*, a qual demonstrou maior similaridade com *M. novocastrense*.

O gênero *Gordonia* é mais facilmente confundido com membros do gênero *Mycobacterium*. No entanto pode ser distinguido pela quantidade de ácidos micólicos significativamente menor na constituição da parede celular (48-66 carbonos em comparação com 60 a 90 carbonos para micobactérias). Essa diferenciação no perfil dos ácidos graxos de cadeia longa na constituição da

membrana celular confere ao gênero *Gordonia* resistência ácido-álcool, mais baixa que as espécies do gênero *Mycobacterium* e em geral mais alta que aos gêneros *Nocardia* e *Rhodococcus*. (STACKEBRANDT, SMIDA; COLLINS, 1988, QUINN et al. 2005).

Algumas espécies do gênero *Gordonia* são provenientes de reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Rhodococcus* (exemplo: *Rhodococcus bronchialis*, *Rhodococcus rubropertinctus*, *Rhodococcus sputie* *Rhodococcus terrae*) Alguns autores relatam a dificuldade de identificar espécies de *Gordonia* por métodos tradicionais e a impossibilidade de distingui-las do gênero *Rhodococcus*, devido ao estreito relacionamento entre esses gêneros (STACKEBRANDT, SMIDA; COLLINS, 1988).

A identificação de espécies de *Gordonia*, assim como a diferenciação destas para o gênero relacionado *Rhodococcus* nem sempre é possível com base nas características bioquímicas. Vários estudos utilizaram a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação de gênero e/ou espécies, inclusive quando observaram falhas na identificação por métodos convencionais e sistemas comerciais automatizados e mostraram a eficácia desta metodologia aplicada a isolados de origem clínica (FUNKE; BERNARD, 2003).

Foram relatados por Wright et al (2012) casos de 3 pacientes do sexo masculino que foram submetidos a uma cirurgia no miocárdio e apresentaram em 44 dias do pós-operatório uma infecção no esterno por *G. bronchialis*. A enfermeira anestesista foi considerada a fonte da infecção através do seu uniforme contaminado pela *G. bronchialis* presente em biofilmes em sua máquina de lavar roupas. O surto foi finalizado após a eliminação da máquina contaminada (WRIGHT et al, 2012).

Lai et al (2009) também descreveram nove casos, obtendo quinze isolados, de vários tipos de infecções causadas por *Gordonia spp.* de 1997 a 2008, em um centro médico em Taiwan. Inicialmente os isolados foram identificados como *Rhodococcus spp.* por métodos bioquímicos convencionais e posteriormente foram analisados para avaliar a precisão da identificação de espécies por meio de métodos moleculares (PCR e sequenciamento de RNAr). *Gordonia sputi* foi a espécie mais comum, seguida por *Gordonia terrae*. Cinco pacientes apresentaram septicemia, sendo dois deles relacionados à contaminação do cateter. Dois

pacientes tiveram infecções de tecidos moles e outros dois pacientes tinham ceratite infecciosa e conjuntivite. A incapacidade dos sistemas de identificação convencionais para identificar com precisão *Gordonia spp.* muitas vezes resulta em erro no diagnóstico de infecções, por serem patógenos raros, que exigem sequenciamento genômico para a identificação precisa.

Em outro trabalho realizado entre Janeiro de 2001 até maio de 2006 no estado de Utah, Estados Unidos foram identificados 8 doentes com infecção invasiva. Os pacientes eram crianças com idade até 18 anos. Foram obtidos 5 isolados de *Rhodococcus*, 2 isolados de *Nocardia* e 1 isolado de *Gordonia*. A partir do sequenciamento do 16S rRNA foi confirmado que 3 dos 4 *Rhodococcus* isolados e 1 dos 2 *Nocardia* isolados eram, na verdade, espécies de *Gordonia* (3 *Gordonia terrae* e 1 *Gordonia otidis*, uma espécie recém reconhecida). A espécie de *Gordonia* isolada e identificada pela microbiologia convencional também foi submetida ao sequenciamento e confirmada como *Gordonia bronchialis*. Além disso, um organismo que foi identificado como um bacilo gram positivo foi isolado a pedido do tratamento médico e identificado como *G. terrae*. Estes resultados conduziram à identificação de 6 episódios de infecção invasiva (5 episódios de bacteremia por *Gordonia* e um episódio de ventriculite) em 5 crianças. Todos pacientes tinham um cateter implantado como seu principal risco para a infecção, além disso, três pacientes tinham imunodeficiências congênitas ou adquiridas (BLASCHKE et al 2007).

Nas três amostras isoladas (amostras 49, 53 e 54) no presente estudo, foi feito sequenciamento de DNA (412, 424 e 431 pares de base respectivamente) da região *hsp65*, a qual demonstrou maior similaridade com *Gordonia bronchialis*.

Na produção de QMA existe uma série de fatores que pode aumentar a possibilidade de contaminação externa dos produtos por microrganismos contaminantes como os apresentados no presente estudo, como:

- São fabricados com leite não pasteurizado;
- A manipulação do queijo durante o processo de produção é muito maior, se comparado à produção de queijo realizada em indústrias;
- A estrutura física das salas de fabricação de queijos muitas vezes possuem deficiência do ponto de vista sanitário;

- Mesmo com treinamentos realizados pelos órgãos oficiais, muitas vezes o nível de informação dos manipuladores sobre Boas Práticas na Manipulação de alimentos é insuficiente;
- O transporte dos queijos das propriedades até a Cooperativa nem sempre é realizado da forma correta e na temperatura adequada;
- A água utilizada na higienização das salas de produção de queijo, equipamentos e utensílios passam apenas por cloração, que muitas vezes não é realizada de maneira correta. Além disso, esse processo não eliminaria a presença de várias espécies de MNT, que são resistentes à cloração.

Além dos fatores externos citados, um fator intrínseco à saúde animal também importante pode estar associado à presença de MNT nas amostras analisadas: a possível presença de vacas com mastite específica pelo agente em questão, que não é analisada rotineiramente. Varias publicações internacionais associam a presença de MCR à mastite subclínica em bovinos como causa principal da infecção ou simplesmente associada a outros patógenos como *S. agalactiae*, *S. uberis*. (RICHARDSON, 1970; SCHULTZE, 1987; THOMSON, 1988). *M. Novocastrense* também foi isolada em uma amostra de tanque de expansão em trabalho realizado em São Paulo, onde 24 (8%) das amostras dentre 300 analisadas, apresentaram resultado positivo para MNT (FRANCO, 2012)

A presença de MNT em amostras de leite e também em queijos produzidos a partir de leite cru, como o QMA, pode estar associada à presença de animais infectados no rebanho. Embora, fontes ambientais sejam as principais formas de contaminação do leite cru.

As causas de reações inespecíficas nos testes de tuberculização incluem a paratuberculose, infecção ou exposição ao MAC, micobacterioses cutâneas ou exposição às MNT (MONAGHAN et al., 1994), as quais são frequentes. Entretanto, a legislação brasileira não incluiu nenhuma MNT em programas nacionais de controle, aparecendo apenas como diagnóstico diferencial de tuberculose animal (BRASIL, 2001).

A legislação estadual para a fabricação do QMA não faz ainda nenhuma menção ao diagnóstico da presença de *Mycobacterium spp.*, *Gordonia spp.* ou outros Actinomicetos no rebanho, tampouco nos queijos produzidos. Essa lacuna na

legislação seria algo para reflexão, dada a importância das MNT à saúde pública, principalmente quando destinados a grupos específicos como pacientes com imunossupressão.

A comercialização dos queijos com período de maturação inferior a 17 dias é um hábito rotineiro e praticado pelos produtores de queijo da região do Serro, o que pode ser uma prática de risco ao consumidor.

Este curto período de maturação não é suficiente para que ocorram reações bioquímicas importantes e também para atingir pH ideal para a inativação de vários patógenos, incluindo os dos gêneros *Mycobacterium* e *Gordonia*.

Esta falta de fiscalização do processo de produção como um todo, desde a aquisição de animais, passando pelo controle sanitário do rebanho, Boas Práticas de Fabricação, controles da água, da matéria prima, do armazenamento e do transporte pode prejudicar a qualidade final do produto e incorrer em riscos à saúde do consumidor.

Para um maior controle das propriedades produtoras de QMA, o IMA deveria identificá-las como propriedades de risco, seguindo protocolo semelhante ao descrito no Manual de vigilância veterinária de doenças vesiculares, 2007, adotado pelo MAPA (BRASIL,2007b).

Resumidamente, o manual descreve as seguintes atividades de acompanhamento: obtenção e registro de informações epidemiológicas relevantes; consolidação e análise dos dados recolhidos; decisão e estabelecimento dos procedimentos preventivos; execução das operações de emergência; e notificação e divulgação de comunicados com informações sobre a doença e sobre os resultados das medidas aplicadas em todos os meios disponíveis para atingir grande parte dos envolvidos pelo sistema de vigilância.

7- CONCLUSÃO

O resultado positivo obtido neste para presença de Micobactérias não tuberculosas (MNT) e Actinomicetos em Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro, somados ao potencial patogênico fortalecem a necessidade de novas investigações, visando maior elucidação do significado da presença destes microrganismos em produtos lácteos no Brasil e suas possíveis associações com casos humanos.

Outro aspecto que precisa ser avaliado mais detalhadamente para QMA é o período de maturação que seria efetivo para inativar patógenos específicos como os encontrados no presente estudo, uma vez que o período de maturação em que o queijo é comercializado hoje, não é suficiente para eliminação destes.

8 – REFERÊNCIAS

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

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402,1997.

APPUSWAMY, S.; BATISH, V.K.; PARKASHI, O.M.; RANGANATHAN, B. Prevalence of mycobacteria in raw milk sampled in Karnal, India. **Journal of Food Protection** , v. 43, n. 4, p. 778-781, 1980.

BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias não-tuberculosas no Brasil. **Bol. pneumol. sanit.**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2000.

BELCHIOR, A.P.C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco de tuberculose bovina em Minas Gerais. 2001. 55p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BEN SALAH, I.; ADÉKAMBI, T.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. **Microbiology**, v. 154, p. 3715-3723. 2008.

BLASCHKE, ANNE J. et al. *Gordonia* species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16s ribosomal rna gene sequencing. **Clinical infectious diseases**, v. 45, p. 483-486, jul. 2007.

BOUDEWIJNS M, Bakkers JM, Sturm PD, Melchers WJ. 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? **J Clin Microbiol**, v.44 , n.9, p. :3469-3470,2006.

BRASIL. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA, de 18 de dezembro de 1950.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. **Institui o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Diário Oficial da União, Brasília, p. 5,11 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1. ed. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007 .Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br> Acesso em: 12 jan. 2016.

BRASIL. Manual de vigilância veterinária de doenças vesiculares MAPA, de outubro de 2007. Brasília, DF: MAPA, 2007.

BRASIL- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Conjunta nº01/2009 SVS/MS e ANVISA. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013**. Brasília, DF: MAPA, 2013.

CLARRIDGE, J E . Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, 17(4), 840-862,2004

CLOUD, J. L. et al. Identification of Mycobacterium spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries.

J Clin Microbiol, v. 40,n. 2, p. 400-6, 2002.

COWMAN, S., WILSON, R., LOEBINGE, M.R.. **Opportunistic mycobacterial diseases Infection**. v.40 n. 6, 346-348, 2012.

CUNHA, M.F, BALLUS, C.A. Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis: uma preocupação para a indústria de laticínios. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, jan /fev , n 366 , v.64, p.3-11, 2009.

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

DIAS, J.C. **Uma Longa e Deliciosa Viagem**. 1. ed. Editora Barleus, 2010. 168p.

DIAS, R. S. et al. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de linhagens enterotoxigênicas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. **Revista da Fundação Ezequiel Dias**, v. 3, n. 2, p. 37-44, 2008.

DORAN, P.; CARSON, J; COSTELLO, E; MORE, S. J. An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on a irish dairy farm, following the consumption of raw milk. **Irish Veterinary Journal**, v. 1, n. 62, p. 390-397, 2009.

DORES, M.T. e FERREIRA, C.L.L.F. **Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e Desafios**, Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.2, n.2., p.26-34, Dezembro, 2012

GÓMEZ, N.A. Micobacterias no tuberculosas: una infección emergente? **Na. Pediatr**. v.71 n.3, 185-188, 2009.

GUINDI SM, AHMED OL, AWAD WM, EL-SABAN MS, SABAN MA. Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products. **Agriculture Res Rev V**. 58 N. 1 p.75-84.1980.

FALKINHAM, J.O. Effects of Biocides and Other Metal Removal Fluid Constituents on *Mycobacterium immunogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2057–2061. 2009.

FARIA, A.C.S.. Short communication: viable mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in retail artisanal coalho cheese from northeastern brazil. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 7, p. 4111-4114, 2014.

FORBES, B. A., SAHM, D. F., WEISSFELD, A. S. Barley & Scott - **Diagnostico microbiológico**. Ed. Medica Panamericana S.A. 12ª ed., 2009.

FUNKE, G; BERNARD, K. A. Coryneform Gram-Positive Rods. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, Jorgensen, J. H., F. C., Tenover, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th Ed. ASM Press, Washington. D. C, 2003.

HOLSINGER, V.H.; RAJKOWSKI, K.T.; STABEL, J.R. Milk asteurization and safety: a brief history and update. **Scientific and Technical Review**, v. 12, n. 2,p.441-451. 1997.

HRUSKA, K.; KAEVSKA, M.. Mycobacteria in water, feedstocks and food: analysis of publications. **Veterinarni medicina**, Veterinary research institute, Brno, Czech Republic , v. 55, n. 12, p. 571-580, 2010.

INAO, **Institut National de Origine et de la Qualité**. Disponível em <<http://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQO/Appellation-d-origine-protegee-Appellation-d-origine-controlee> > 2016, Acesso em Maio/2016.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Queijo artesanal de minas, patrimônio cultural do Brasil**. Vol 1, 2006. 156p.

JORGE, K.S.G., Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica. 2010. 88p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

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

KONUİK, K.; KORCAN, E.; DULGERBAKI., S.; ALTINDIS, M. Isolation and identification of Micobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 343-347, 2007.

LAI, C. C. et al. Infections caused by gordonia species at a medical centre in taiwan, 1997 to 2008. **Clin microbiol infect**, Taiwan, v. 16, p. 1448-1443, 2010.

LEÃO S.C. et al. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria**. p.9-147,2004.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. . Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LOACHIMESCU, J. W. TOMFORD O. C.. Nontuberculous mycobacterial disorders. **The cleveland clinic foundation**, , ago. 2010. Disponível em : <<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/nontuberculous-mycobacterial-disorders/>> Acesso em: Abril,2016

LIMA, A. S. Fatores e espécies de micobactérias não tuberculosas associadas aos casos de micobacterioses pulmonar e extrapulmonar no estado de Pernambuco.2014.78p Tese (Doutorado em saúde pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

MERGAREJO NETTO, M. **A geografia do queijo minas artesanal**. 2011. 420 f. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro – São Paulo, 2011.

MINAS GERAIS - EMATER-MG - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Caracterização da Microrregião do Serro como Produtora tradicional de Queijo minas artesanal, 2002**.

Disponível em: < <http://www.emater.mg.gov.br> >. Acesso em 16/11/2014

MINAS GERAIS - EMATER-MG - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Mapa do Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: < <http://www.emater.mg.gov.br> >. Acesso em 16/11/2014.

MINAS GERAIS - IEPHA. Governo de Minas Gerais. Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. **Decreto nº 42.505, de 15 de abril de 2002 que institui as formas de registros de bens culturais de natureza imaterial ou intangível que constituem patrimônio cultural de Minas Gerais**. Belo Horizonte

MINAS GERAIS. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o Processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providencias**. Minas Gerais, Belo Horizonte, 1 fev. 2002.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 517, de 14 de Junho de 2002. **Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal**.. Belo Horizonte, 14 de Junho de 2002.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 518, de 14 de Junho de 2002. **Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal**. Belo Horizonte, 14 de Junho de 2002

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 523, de 02 de Julho de 2002. **Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal.** Belo Horizonte, 02 de Julho de 2002.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 591, de 26 de maio de 2003. **Identifica a Microrregião do Serro.** Belo Horizonte, 26 de maio de 2003.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 594, de 10 de maio de 2003. **Identifica a Microrregião de Araxá.** Belo Horizonte, 10 de maio de 2003.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 619, de 01 de dezembro de 2003. **Identifica a Microrregião do Alto Paranaíba.** Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2003.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004. **Identifica a Microrregião da Canastra.** Belo Horizonte, 17 de novembro de 2004.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 818, de 12 de dezembro de 2006 - **Regulamento Técnico de Produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências.** Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2006.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 874, de 02 de outubro de 2007. **Altera a denominação da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo minas artesanal.** Belo Horizonte, 02 de outubro de 2007.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. **Identifica a Microrregião do Campo das Vertentes.** Belo Horizonte, 03 de novembro de 2009.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1397, de 13 de fevereiro de 2014. **Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro.** Belo Horizonte, 13 de fevereiro de 2014.

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1428, de 29 de agosto de 2014. **Identifica a Microrregião da Serra do Salitre como produtora de queijo minas artesanal.** Belo Horizonte, 29 de agosto de 2014.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. **The tuberculin test. *Veterinary Microbiology***, v. 40, p.111-124. 1994.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLE, Michael A. **Medical microbiology**. 7 ed. [S.L.]: Elsevier, 2014. 227-229 p.

NERO L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 211-215. 2004.

OKONECHNIKOV K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics** v. 28: p.1166-1167, 2012.

PITOMBO, Marcos Bettini, et al. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional?. **Rev bras ginecol obstet.**, v. 31, n. 11, p. 529-533 ,2009.

PIRES, M. C. S.. **Memória e arte do queijo do Serro: o saber sobre a mesa**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2013.

PIRES, Maria C. S. **Produção artesanal do queijo do Serro**. Belo Horizonte 2003.
Disponível em: http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires_01.pdf Acesso em: Fev/2016

PLAUS, WJ; G, HERMANN. The surgical management of superficial infection caused by atypical mycobacteria. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v. 118, n. 11, p. 846-847, 2011

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM III, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 17, n. 1, p.98-106. 2004.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

THOMSON, JR; MOLLISON, N; MATTHEWS, KP. An investigation of mastitis due to *S agalactiae*, *S uberis* and *M smegmatis* in a dairy herd..**The Veterinary record**, v. 122, n. 12, p. 271-274, mar. 1988.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v. 48, p. 159–178, 2006.

RENISS – Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. Casos de infecção por micobactérias não tuberculosas notificadas. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf , 2009. Acesso em: Fev/2016.

RIBEIRO, J. de A. **A evolução da tecnologia queijeira**. 1958.

RIBEIRO, J. de A. **Queijo do Brasil**. 1959

RICHARDSON, A.. Bovine mastitis associated with mycobacterium smegmatis and an untypable mycobacterium. **The veterinary record**, v. 17, n. 86, p. 497-498, abr. 1970.

ROCHA, B.B., SILVA, M.R., SOUZA, G.N., MOREIRA, M.A.S., FARIA, L.S., Prevalência e fatores associados ao consumo de queijo não pasteurizado entre pacientes com tuberculose de uma área urbana do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 96-100, abr./jun. 2014

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 1, n. 18, p. 101-108, 1997.

RUNYON, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.43, p.273-290, 1959.

SANCHEZ, I.; ROSELL, R. Principales fuentes de infeccion de micobacterias atipicas en unidades bovinas. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**. v. 14, n. 1, p.29-33. 1983.

SANGER F; NICKLEN S; COULSON AR, Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. natl. acad. sci**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SCHULTZE,WD; WB, Brasso. Characterization and identification of mycobacterium smegmatis in bovine mastitis..**American journal veterinary research**, v. 48, n. 5, p. 271-274, mar. 1988.

SESSO. R, WYTON. S, PINTO. L. Epidemic glomerulonephritis due to *Streptococcus zooepidemicus* in Nova Serrana, Brazil. **Kidney Int**. 2005;Suppl 97:S132-S136.

SILVA et al. Técnicas básicas de detecção da presença/ausência de microrganismos. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Ed. Varela. p. 83-93,2010.

STACKEBRANDT, E; SMIDA, J; COLLINS, M. D. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus* : revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). **The Journal of General Applied Microbiology** ,v. 34, p. 341-348, 1988.

STEPHEN, L.O.; SCOTT, J.W.; BRUCE, A.W. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. **Prev. Vet. Med.**, v.40, p.179-192, 1999.

TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BÖTTGER EC, BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol.** V. 21, n. 2 p 175-178, Fev. 1993.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. Micobactérias, p.409-422. **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p

UEKI, S.Y.M.(2005). Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 41(suppl 1), 1-8.

VAEREWIJCK, M.J.M.; HUYS, G.; PALOMINO, J.C.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p. 911–934. 2006.

YODER, S.; ARGUETA, C.; HOLTZMAN, A.; AROSON, T.; BERLIN, O.G. W.; TOMASEK, P.; GLOVER, N.; FROMAN, S.; STELMA JR, G. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. **Applied and Environmental Mycrobiology**, v. 65, p. 65, 2650-2653, 1999.

ZAMARIOLI, L.A., COELHO, A.G.V., PEREIRA, C.M., NASCIMENTO, A.C.C., UEKI, S.Y.M., CHIMARA, E. Estudo descritivo da freqüência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). **J. Bras. Pneumol.** v.34 n. 8, 590-595. 2008.

ZANINI, M.S. *Identificação de Micobacterium bovis* em leite através da reação em cadeia de polimerase – PCR. 1998. 52p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, UFMG,-1998

9 - ANEXOS

Anexo A

Resultado Amostra 46

AMOSTRA 46, 4 SEQUENCIAS, 441 PB

>46_2_A01

ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTACCGAGGGTATGCGGTTGACAAG

>46_2_B01

ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTACCGAGGGTATGCGGTTGACAAG

>46_3_A01

ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTACCGAGGGTATGCGGTTGACAAG

>46_3_B01

ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTACCGAGGGTATGCGGTTGACAAG

>46_CONSENSO

ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC
ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC
AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTACCGAGGGTATGCGGTTGACAAG

Segue a amostra 46. Deu 0 de e-value. Perfeito. Fora isso, as 4 sequencias usadas tiveram 100% de identidade.

Mycobacterium novocastrense strain InDRE Sonora705 65 kDa heat shock protein (hsp65) gene, partial cds

Sequence ID: gb|JX154123.1|Length: 441Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 441GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Plus
746 bits (826)	0.0	430/441 (98%)	0/441 (0%)	Plus/Plus	
Query 1	ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC	60			
Sbjct 1	ACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC	60			
Query 61	GGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC	120			
Sbjct 61	GGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGCTCGCCGGGACGGCACC	120			
Query 121	ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC	180			
Sbjct 121	ACCACCGCCACCGTGTGTCGCCAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCGATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC	180			
Query 181	GGCGCCAAACCGCTCGGCCCTAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGATCACCGAG	240			
Sbjct 181	GGCGCCAAACCGCTCGGCCCTAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGATCACCGAG	240			
Query 241	ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCG	300			
Sbjct 241	ACGCTGCTGAAGTCGGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGACCAAGATCGCCGCCACCGCCGCG	300			
Query 301	ATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC	360			
Sbjct 301	ATCTCGGCCGGGACACCCAGATCGGTGAGCTTATCGCCGAGGGCATGGACAAGGTCGGC	360			
Query 361	AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCAC	420			
Sbjct 361	AAGGAAGGGCTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCAC	420			
Query 421	GAGGGTATGCGGTTGACAAG	441			
Sbjct 421	GAGGGTATGCGGTTGACAAG	441			

ANEXO B

Resultado da mostra 49

>49 (28-07)

CGCATACCCTCGGTGAGCTCGAGCTGGAGTCCGAAGGTGTTGGACTCCTCGACGGTGATGACGCCTAGACTTGCCGACCTT
 GATCCATCGCCTCGGGGATAAGCTCGCCGATCGAGGGGTGCGCTGCCGAGATACCAGCGGTGCGAGCGATCTGCTCCTTGG
 TCTCGACTCCTTGGCGCTCTTTCAGCAGCGACTCGGTGACGGCTTCGACAGCCTGCTCGATGCCGCGCTTGAGGCCCATCG
 GGTGGCGCCTGCGGCCACGTTGCGCAGACCCTCGCGCACGAGTGCCTGAGCCAGAACGGTTGCGGTGGTGGTGGCGTCGCC
 AGCGACGTCGTGAGTCTTCTTGGCGACCTCCTTGACGAGCTCGGCACCGATCTTCTCGTACGGGTCTCCAGCTCGATCCCC
 TTGGCGATGGACACACCATCGTTGGTAATC

>49 - CONSENSO

CGCATACCCTCGGTGAGCTCGAGCTGGAGTCCGAAGGTGTTGGACTCCTCGACGGTGATGACGCAAACTTGCCGACCTTGT
 CCATCGCCTCGGGGATAAGCTCGCCGATCGAGGGGTGCGCTGCCGAGATACCAGCGGTGCGAGCGATCTGCTCCTTGGTCTCG
 ACCTCCTTGGCGCTCTTTCAGCAGCGACTCGGTGACGGCTTCGACAGCCTGCTCGATGCCGCGCTTGAGGCCCATCGGGTGGC
 GCCTGCGGCCACGTTGCGCAGACCCTCGCGCACGAGTGCCTGAGCCAGAACGGTTGCGGTGGTGGTGGCGTCGCCAGCGACGT
 CGTCAGTCTTCTTGGCGACCTCCTTGACGAGCTCGGCACCGATCTTCTCGTACGGGTCTCCAGCTCGATCCCCCTTGGCGATG
 GACACACCATCGTTGGTAATC

Gordonia bronchialis DSM 43247, complete genome

Sequence ID: gb|CP001802.1|Length: 5208602Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 762749 to 763183GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Minus
671 bits(363)	0.0	412/436 (94%)		1/436 (0%)	

Features:

chaperonin GroEL

Query	1	CGCATACCCTCGGTGAGCTCGAGCTGGAGTCCGAAGGTGTTGGACTCCTCGACGGTGATG	60
Sbjct	763183	CGCATGCCCTCGGTGAGCTCGAGCTGGAGTCCGAAGGTGTTGGACTCCTCGACGGTGATG	763124
Query	61	ACGCAAACTTGCCGACCTTGATCCATCGCCTCGGGGATAAGCTCGCCGATCGAGGGGTC	120
Sbjct	763123	ACGCCTTCTTGGCGACCTTG-TCCATCGCCTCGGGGATGAGCTCGCCGATCGAGGGGTC	763065
Query	121	GCCTGCCGAGATACCAGCGGTGCGAGCGATCTGCTCCTTGGTCTCGACCTCCTTGGCGCT	180
Sbjct	763064	GCCGGCCGAGATACCAGCGGTGGCAGCGATCTGCTCCTTGGTCTCGACCTCCTTGGCGCT	763005
Query	181	CTTCAGCAGCGACTCGGTGACGGCTTCGACAGCCTGCTCGATGCCGCGCTTGAGGCCCAT	240
Sbjct	763004	CTTCAGCAGCGACTCGGTGACTGCGTTCGACAGCCTGCTCGATGCCACGCTTGAGGCCCAT	762945
Query	241	CGGGTTGGCGCCTGCGGCCACGTTGCGCAGACCCTCGCGCACGAGTGCCTGAGCCAGAAC	300
Sbjct	762944	CGGGTTGGCGCCTGCGAGCGAGTTGCGCAGGCCCTCACGCACGAGTGCCTGAGCCAGAAC	762885
Query	301	GGTTGCGGTGGTGGTGCCGTGCGCAGCGACGTCGTGAGTCTTCTTGGCGACCTCCTTGAC	360
Sbjct	762884	GGTTGCGGTGGTGGTGCCGTGCGCAGCGACGTCGTGAGTCTTCTTGGCGACCTCCTTGAC	762825
Query	361	GAGCTCGGCACCGATCTTCTCGTACGGGTCTCCAGCTCGATCCCCCTTGGCGATGGACAC	420

Anexo C

Resultado Amostra 53

AMOSTRA 53

```
>53_1_A6
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_1_B6
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_1_G5
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_1_H05
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_2_C01
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_2_G01
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_3_F1
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGTGAAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_3_F1
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGTGAAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_4_E02
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGTGAAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_4_F02
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
>53_CONSENSO
GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGGCACCCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGC
CGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGCCGAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAACCGAGTCTGCTGTAAGAGCGCCAAAGGAGTTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGCTGGTATC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG
```

```
Gordonia bronchialis DSM 43247, complete genome
Sequence ID: gb|CP001802.1|Length: 5208602Number of Matches: 4
Related Information
Range 1: 762749 to 763193GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match
Alignment statistics for match #1
Score Expect Identities Gaps Strand
708 bits(784) 0.0 424/445(95%) 0/445(0%) Plus/Plus
Features:
chaperonin GroEL
Query 1 GATTACCAACGATGGTGTGTCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAA 60
Sbjct 762749 GATCACCAACGATGGTGTGTCATTGCCAAAGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAA 762808
Query 61 GATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGGTCGCCAAGAAGACTGACGACGTCGCTGGCGACGG 120
Sbjct 762809 GATCGGCGCCGAGCTCGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTCGAGGCGACGG 762868
Query 121 CACCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCACTCGTGGCGAGGGTCTGCGCAACGTGGC 180
Sbjct 762869 CACCACCACCCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCACTCGTGGTGGAGGGCTGCGCAACGTGGC 762928
Query 181 CGCAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGCGGCATCGAGCAGGCTGTCGAAGCCGTCAC 240
Sbjct 762929 TGCAGGCGCCAAACCCGATGGGCTCAAGCGTGGCATCGAGCAGGCTGTCGACGCAGTCAC 762988
Query 241 CGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGC 300
Sbjct 762989 CGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCTGCCACCGC 763048
Query 301 TGGTATCTCGGCAGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGT 360
Sbjct 763049 TGGTATCTCGGCGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGT 763108
Query 361 CGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCT 420
Sbjct 763109 CGGCAAGGAAGGCGTCAACCCGTGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCT 763168
Query 421 CACCAGGGGTATGCGGTTTCGACAAG 445
Sbjct 763169 CACCAGGGCATGCGCTTCGACAAG 763193
```

Anexo D

Resultado Amostra 54

AMOSTRA 54

>54_2_D01
GATTACCAACGATGGTGTGCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGTGGCCGAGCTCGTCAAGGAGTCCGCAAGAAGACTGACGACGCTGCTGGCGACGGCACACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCAC
CGTAGGGCTGCGCAACGCTGCTGCAGGCGCAACCCGATGGGCTCAAGCGCGCATCGAGCAGGCTGTGCAGCAGTCAACCGAGTCCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGTCCGAGACCAAGGAGCAGATCGTCCACCCTGGTATCTC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCCGCAAGGAAGGCGTCAACCGTCCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGTATGCGGTTCCACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGC
...
>54_CONSENSO
GATTACCAACGATGGTGTGCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAAGATCGTGGCCGAGCTCGTCAAGGAGTCCGCAAGAAGACTGACGACGCTGCTGGCGACGGCACACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCAC
CGTAGGGCTGCGCAACGCTGCTGCAGGCGCAACCCGATGGGCTCAAGCGCGCATCGAGCAGGCTGTGCAGCAGTCAACCGAGTCCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGTCCGAGACCAAGGAGCAGATCGTCCACCCTGGTATCTC
GCGACCCCTCGATCGCGGAGCTATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCCGCAAGGAAGGCGTCAACCGTCCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAGCTCACCAGGGTATGCGGTTCCACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGC

Gordonia bronchialis DSM 43247, complete genome
Sequence ID: gb|CP001802.1|Length: 5208602Number of Matches: 4
Related Information|
Range 1: 762749 to 763193GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1
Score Expect Identities Gaps Strand
740 bits (820) 0.0 431/445 (97%) 0/445 (0%) Plus/Plus

Features:
chaperonin GroEL
Query 1 GATTACCAACGATGGTGTGCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGAGGACCCCTACGAGAA 60
Sbjct 762749 GATCACC AACGATGGTGTGCCATTGCCAAAGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAA 762808
Query 61 GATCGGTGCCGAGCTCGTCAAGGAGTCCGCAAGAAGACTGACGACGCTGCTGGCGACGG 120
Sbjct 762809 GATCGGCGCCGAGCTCGTCAAGGAGTCCGCAAGAAGACCACGACGCTCGCAGGGCAGCGG 762868
Query 121 CACCACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCACTCGTGCCTGAGGGCTCGCGCAACGTCGC 180
Sbjct 762869 CACCACCACCGCAACCGTTCTGGCTCAGGCACTCGTGCCTGAGGGCTCGCGCAACGTCGC 762928
Query 181 TGCAGGCGCAACCCGATGGGCTCAAGCGCGCATCGAGCAGGCTGTGCAGCAGTCA 240
Sbjct 762929 TGCAGGCGCAACCCGATGGGCTCAAGCGTGGCATCGAGCAGGCTGTGCAGCAGTCA 762988
Query 241 CGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGTCCGAGACCAAGGAGCAGATCGTCCACC 300
Sbjct 762989 CGAGTCGCTGCTGAAGAGCGCCAAAGGAGTCCGAGACCAAGGAGCAGATCGTCCACC 763048
Query 301 TGGTATCTCGGCTGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTCATCGCCGAGGCGATGGACAAG 360
Sbjct 763049 TGGTATCTCGGCTGGCGACCCCTCGATCGGCGAGCTCATCGCCGAGGCGATGGACAAG 763108
Query 361 CGGCAAGGAAGGCGTCAACCGTCCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAG 420
Sbjct 763109 CGGCAAGGAAGGCGTCAACCGTCCGAGGAGTCCAACACCTTCGGACTCCAGCTCGAG 763168
Query 421 CACCGAGGGTATGCGGTTCCGACAAG 445
Sbjct 763169 CACCGAGGGTATGCGGTTCCGACAAG 763193