

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

Fúlvia de Fátima Almeida de Castro

**Avaliação da frequência e dos fatores de risco para presença de *Brucella*
em queijos artesanais feitos de leite cru de diferentes regiões de Minas
Gerais e uma do Piauí**

Juiz de Fora
2024

Fúlvia de Fátima Almeida de Castro

**Avaliação da frequência e dos fatores de risco para presença de *Brucella*
em queijos artesanais feitos de leite cru de diferentes regiões de Minas
Gerais e uma do Piauí**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Coorientador: Dr. Henrique Oliveira Frank

Juiz de Fora

2024

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

de Fátima Almeida de Castro, Fúlvia.

Avaliação da frequência e dos fatores de risco para presença de Brucella em queijos artesanais feitos de leite cru de diferentes regiões de Minas Gerais e uma do Piauí / Fúlvia de Fátima Almeida de Castro. -- 2024.

68 p.

Orientador: Márcio Roberto Silva

Coorientador: Henrique Oliveira Frank

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, 2024.

1. Brucelose. 2. Queijo Minas artesanal. 3. Maturação. 4. Nested PCR. I. Roberto Silva, Márcio , orient. II. Oliveira Frank, Henrique , coorient. III. Título.

Fúlvia de Fátima Almeida de Castro

**Avaliação da frequência e dos fatores de risco para presença de *Brucella*
em queijos artesanais feitos de leite cru de diferentes regiões de Minas
Gerais e uma do Piauí**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Aprovada em 13/12/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Roberto Silva - Orientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Henrique Oliveira Frank - Coorientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Documento assinado eletronicamente por Marcio Roberto Silva, Usuário Externo, em 16/12/2024, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Henrique Oliveira Frank, Usuário Externo, em 17/12/2024, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por João Batista Ribeiro, Usuário Externo, em 06/01/2025, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por ANTONIO AUGUSTO FONSECA JUNIOR, Usuário Externo, em 21/01/2025, às 14:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 2134117 e o código CRC 2BC1E9CA.

Dedico este trabalho ao Guilherme, meu grande amor, companheiro de longa caminhada e responsável por me fazer rir. Muito obrigada pelo apoio e por estar sempre ao meu lado para o que der e vier.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser bom o tempo todo comigo e por nunca me faltar com persistência, coragem e sonhos para encarar a vida com seus percalços e alegrias.

Agradeço à minha família, que foi meu apoio e refúgio nos momentos de felicidade, cansaço, vitórias, medo, dúvida e tristeza, em especial aos meus amados filhos Pedro, Lucas e Maria, que são a razão da minha vida.

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, que proporciona aos estudantes conhecimento por meio de professores renomados que integram a Pós-Graduação em Tecnologia de Leite e Derivados, em especial ao meu orientador e professor Dr. Márcio Roberto Silva, que me acompanhou, orientou e acolheu desde a graduação até a realização da pós-graduação. Muito obrigada por confiar em mim e por sua paciência durante as aulas de bioestatística. Levarei você sempre guardado em meu coração.

Agradeço ao professor Dr. João Batista Ribeiro, por todo o ensinamento e apoio compartilhado durante as aulas de Genética de Microrganismos. Minha admiração e respeito.

Agradeço ao professor Paulo Henrique pelo conhecimento compartilhado durante as aulas de Química do Leite e seus Derivados. O senhor é um dos profissionais que mais admiro e em quem me espelho, tanto pessoal quanto profissionalmente.

Agradeço à Embrapa Gado de Leite e ao Laboratório de Microbiologia do Leite, que me permitiram, por meio do estágio, adquirir novas experiências e, assim, acrescentar mais conhecimento à minha vida profissional.

Agradeço ao Dr. Henrique Frank pelo conhecimento compartilhado sobre biologia molecular e pelos esclarecimentos de inúmeras dúvidas que surgiram ao longo de toda a parte prática do meu mestrado.

Agradeço às minhas amigas do mestrado Ana Flávia, Amanda Cirilo, Carolina, Clarice, Stefany e Vitória pelo apoio ao longo da caminhada, em especial a Ana Flávia e Vitória, que, inúmeras vezes, não mediram esforços para me ajudar quando precisei.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante todo o curso de mestrado.

*“O acaso favorece uma mente bem
treinada. As pessoas que se esforçam são
para quem a sorte sorri.”*

Louis Pasteur

RESUMO

A comercialização de queijos artesanais (QA) feitos de leite cru bovino é permitida em alguns países, incluindo o Brasil. Em Minas Gerais (MG), os modos de fazer QA foram reconhecidos como patrimônio histórico imaterial da humanidade pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), sendo que duas regiões conquistaram selos de indicação geográfica (IG): Canastra e Serro. Entretanto, os QA também são produzidos em outras regiões do estado, como Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Serra do Salitre, Serro, Serras da Ibitipoca e Triângulo Mineiro. Apesar dos esforços dos órgãos fiscalizadores, ainda se observam muitos desafios, especialmente no que diz respeito à produção segura para a saúde do consumidor. Nesse sentido, é importante destacar alguns pontos que permanecem em discussão, como os patógenos zoonóticos mais prevalentes nos QA, os fatores de risco para sua presença nesse alimento e a distribuição espacial dos “rebanhos produtores de QA”, considerando que esses produtos geralmente são fabricados em “queijarias” na própria fazenda. Dentre os patógenos veiculados pelo QA e de importância para a saúde pública, nos quais o enfoque da Saúde Única deve ser considerado, *Brucella abortus* se destaca. Dessa forma, a realização de estudos epidemiológicos é fundamental para avaliar a presença e os principais fatores de risco associados a *Brucella abortus* em QA. Além de representarem um avanço no conhecimento da situação sanitária desses “rebanhos produtores de QA”, essas informações podem auxiliar os órgãos de defesa sanitária, fiscalização e inspeção de produtos de origem animal na tomada de decisões quanto à elaboração de procedimentos que visem mitigar o risco de transmissão da brucelose para seres humanos por meio do QA.

Palavras-chave: *Brucella*; queijo Minas artesanal; DNA; maturação; nested PCR.

ABSTRACT

The sale of artisanal cheeses (AQ) made from raw bovine milk is permitted in some countries, including Brazil. In Minas Gerais (MG), the ways of making AQ have been recognized as intangible historical heritage of humanity by the National Historical and Artistic Heritage Institute (IPHAN), and two regions have been awarded geographical indication (GI) stamps: Canastra and Serro. However, QA is also produced in other regions of the state, such as Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Serra do Salitre, Serro, Serras da Ibitipoca and Triângulo Mineiro. Despite the efforts of the inspection bodies, there are still many challenges, especially with regard to production that is safe for consumer health. In this sense, it is important to highlight some points that remain under discussion, such as the most prevalent zoonotic pathogens in QA, the risk factors for their presence in this food and the spatial distribution of “QA-producing herds”, considering that these products are usually manufactured in “cheese factories” on the farm itself. *Brucella abortus* stands out among the pathogens transmitted by QA and of importance to public health, where the One Health approach must be taken into account. Epidemiological studies are therefore essential to assess the presence of *Brucella abortus* and the main risk factors associated with it. In addition to representing an advance in knowledge of the health situation of these “AQ-producing herds”, this information can help health defense, inspection and inspection bodies for animal products to make decisions regarding the development of procedures aimed at mitigating the risk of brucellosis transmission to humans through AQ.

Keywords: *Brucella*; artisanal Minas cheese; DNA; ripening; nested PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Distribuição espacial das agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo artesanal de leite cru positivos - ARFPQ (círculos vermelhos) e negativos (quadrados brancos) para *Brucella* nas regiões Serro, Canastra, Triângulo Mineiro, Cerrado e Parnaíba, respectivamente, em Minas Gerais e Piauí, Brasil, 2018.....49
- Figura 2 - Tendência linear inversa entre as taxas de queijos artesanais de leite cru positivos para *Brucella* e os escores de maturação acima da mediana de 10 dias (inclinação = -0,0053, $p = 0,0001$). Os escores 0, 19, 60, 87 e 100 correspondem às porcentagens de queijos com tempo de maturação acima da mediana em R5, R1, R3, R2 e R4, respectivamente, Brasil, 201852
- Figura 3 - Análise de estimativa de densidade de kernel e densidade de clusters de *Brucella* em agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo (RFCPA) de Minas Gerais e Piauí, Brasil, e mapas coropléticos das distribuições de algumas variáveis relacionadas. (A) Aplicação de KDE e Scan para queijo artesanal de leite cru (RMAC) positivo para *Brucella* em RFCPAs de quatro regiões produtoras de queijo artesanal de Minas Gerais e uma região produtora de queijo artesanal de Coalho, no estado do Piauí (D). Mapas coropléticos das distribuições de casos humanos de brucelose em Minas Gerais (B) e Piauí (E), acumulados no período de 1998 a 2022. Mapas coropléticos das distribuições de RMAC com períodos de maturação de até 10 dias em Minas Gerais (C) e Piauí (F)53
- Figura 4 - Resultado do BLASTn mostrando alguns dos alinhamentos entre a nossa sequência depositada e outras sequências depositadas de *Brucella*54
- Figura 5 - Resultado do BLASTn, no qual a sequência depositada de *Brucella* alinhou com 100% de identidade e sem lacunas com outra sequência depositada de *Brucella*55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise univariada para positividade de <i>Brucella</i> em queijos artesanais feitos de leite cru, Brasil, 2018	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
BAL	Bactérias Ácido-láticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAS	Departamento de saúde animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMATER-MG	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IG	Indicações Geográficas
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
MG	Minas Gerais
NaCl	Cloreto de Sódio
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
QA	Queijo Artesanal
QALC	Queijos Artesanais feitos com leite cru
QMA	Queijo Minas Artesanal
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
TAL	Teste do Anel em Leite
Tris-HCL	Tris (hidroximetil) aminometano
UF	Unidade da Federação

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1 BRUCELOSE	14
1.1.1 Agente etiológico e epidemiologia da brucelose	15
1.1.2 Caráter zoonótico de <i>Brucella abortus</i> no contexto de uma só saúde	16
1.1.3 Fisiopatogenia da doença	18
1.1.4 Situação epidemiológica no Brasil e no estado de Minas Gerais	19
1.1.5 Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal – (PNCEBT)	21
1.2 QUEIJOS ARTESANAIS	22
1.2.1 Histórico do Queijo Artesanal em MG	22
1.2.2 Legislação Relacionada ao Queijo Artesanal no Brasil e no Estado de MG	23
1.2.3 Procedimentos de fabricação do queijo artesanal.....	25
1.2.4 Período de maturação do queijo artesanal e relação com sobrevivência de <i>Brucella abortus</i>	27
1.3 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM REBANHOS	28
1.3.1 Sorologia no leite do rebanho	28
1.3.2 Sorologia em indivíduos	29
1.3.3 Isolamento de <i>Brucella</i>	30
1.3.4 Técnicas baseadas em PCR	31
1.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BRUCELLA ABORTUS EM QUEIJO ARTESANAL.....	31
1.4.1 Técnica molecular – PCR (convencional, nested e tempo real)	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	35
REFERÊNCIAS	35
BRUCELLA EM QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU MINAS E COALHO E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ESPACIAIS COM EXPOSIÇÕES HUMANAS NO BRASIL: UM ROBUSTO ESTUDO TRANSVERSAL.....	39

RESUMO	39
ABSTRACT.....	41
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 DESENHO, LOCAL DO ESTUDO E PLANEJAMENTO AMOSTRAL	44
2.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	45
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE QUEIJOS.....	46
2.3 NESTED-PCR.....	46
2.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA	47
2.5 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS E ESPACIAIS	47
3 RESULTADOS	48
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação terá um tópico de revisão teórica sobre a presença de *Brucella* em queijos artesanais feitos a partir de leite cru. Os resultados do estudo serão apresentados na forma de artigo científico, a ser publicado no periódico *International Journal of Food Microbiology*. A versão em português do referido artigo será apresentada após o tópico 'Objetivo'.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Foi realizada uma breve revisão teórica a fim de analisar a importância da brucelose e os fatores de risco para a presença de *Brucella* em queijo Minas artesanal, produzido no estado de Minas Gerais, e em queijo Coalho artesanal, produzido no estado do Piauí, bem como os possíveis riscos à saúde do consumidor.

1.1 BRUCELOSE

A brucelose é uma doença infectocontagiosa que se manifesta de forma subclínica, possuindo um caráter crônico. É causada por bactérias do gênero *Brucella*, que podem infectar diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, podendo acidentalmente acometer o ser humano (Megid et al., 2020).

Essa doença foi registrada na região do Mediterrâneo e sua história está relacionada a campanhas militares. Sir David Bruce, Hughes e Zammit, que trabalhavam em Malta, conseguiram identificar a doença, e Bang posteriormente descobriu que *B. abortus* era o agente causador do aborto em bovinos. Quando acometia o ser humano, a doença ficou conhecida como febre ondulante (Christopher et al., 2010).

A brucelose também foi chamada de febre de Malta, febre ondulante, febre mediterrânea ou doença de Bang. É causada por bactérias do gênero *Brucella*, pertencentes à família *Brucellaceae*, sendo parasitas intracelulares facultativos que podem se multiplicar no interior de macrófagos (Rocha et al., 2017).

Com relação às características microbiológicas, os microrganismos desse gênero podem ser cocobacilos ou bastonetes curtos, gram-negativos, que se desenvolvem em condições aeróbias ou microaerófilas. São imóveis, sem flagelos, medindo entre 0,5 e 0,7 µm de diâmetro e 0,6 a 1,5 µm de comprimento, não formam esporos e não possuem cápsulas (Rocha et al., 2017).

A brucelose é uma das zoonoses bacterianas mais comuns no mundo, com mais de meio milhão de novos casos anualmente. A taxa de prevalência em alguns países ultrapassa dez casos por 100.000 habitantes, sendo mais frequente em pessoas que trabalham em fazendas. Apesar de ser endêmica em muitos países em desenvolvimento, a brucelose é subdiagnosticada e subnotificada (Christopher et al., 2010).

Entre as bactérias do gênero *Brucella*, a mais predominante é *B. abortus*, representando um grande problema para a saúde pública. A doença tem distribuição cosmopolita e é considerada endêmica no Brasil, sendo diagnosticada em todos os estados, resultando em grandes perdas econômicas para o país (Rocha et al., 2017).

A brucelose está incluída na lista de enfermidades da Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e é considerada uma doença de grande impacto na saúde pública e na economia. Como pode ser motivo de restrições comerciais, sua presença pode gerar consequências significativas para as negociações tanto nacionais quanto internacionais (Rocha et al., 2017).

Os impactos econômicos da brucelose são consideráveis, devido aos prejuízos na saúde animal e na produção de leite e carne. Suas consequências diretas e indiretas são difíceis de mensurar. Além disso, a doença causa problemas reprodutivos nas fêmeas e estima-se que sua presença nos rebanhos reduza a produção de leite em 20 a 25% (Rocha et al., 2017).

Cabe ressaltar que, embora ocasionalmente fatal em seres humanos, a brucelose pode levar à debilitação e incapacidade graves. Estima-se que 2% dos pacientes não tratados podem morrer em decorrência da doença. A brucelose tem tendência à cronicidade e persistência, podendo evoluir para uma condição granulomatosa que compromete todo o organismo. Dessa forma, o diagnóstico oportuno e preciso é fundamental, embora ainda represente um grande desafio para os médicos devido às características clínicas inespecíficas, à lenta taxa de crescimento da bactéria em hemocultura e à dificuldade no sorodiagnóstico (Christopher et al., 2010).

1.1.1 Agente etiológico e epidemiologia da brucelose

A brucelose é causada por uma bactéria gram-negativa, classificada no filo *Proteobacteria*, classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhizobiales*, família *Brucellaceae* e gênero *Brucella*. Análises moleculares indicam que o gênero *Brucella* está intimamente relacionado a patógenos de plantas do gênero *Agrobacterium-Rhizobium* (Megid et al., 2020).

As espécies de *Brucella* têm alta capacidade de adaptação a novos hospedeiros e podem ser naturalmente transmitidas aos hospedeiros primários por

contato direto ou indireto. Em alguns casos, podem infectar acidentalmente outros hospedeiros suscetíveis, incluindo seres humanos (Khurana et al., 2021).

A bactéria pode permanecer viável no ambiente por meses, especialmente em condições frias e úmidas. O processo de pasteurização do leite é eficaz para eliminá-la desse alimento e de seus derivados. Embora *Brucella* não seja móvel, possui todos os genes necessários para a formação de flagelos, exceto aqueles responsáveis pela sua montagem (Khurana et al., 2021).

Entre as espécies de *Brucella*, seis são clássicas e sete foram recentemente reconhecidas em uma ampla gama de hospedeiros suscetíveis. Entre os animais terrestres, destacam-se *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* e *B. microti*. Já *B. ceti* e *B. pinnipedialis* afetam mamíferos marinhos. Além disso, *B. papionis*, isolada de babuínos, e *B. vulpis*, de raposas vermelhas, foram recentemente adicionadas ao gênero *Brucella*. Sete biovars foram identificadas para *B. abortus*, três para *B. melitensis* e cinco para *B. suis*, enquanto outras espécies ainda não foram caracterizadas em biovars (Khurana et al., 2021).

A doença causada por *B. abortus* tem distribuição global, com exceção dos países que conseguiram erradicá-la por meio de programas sistemáticos, como Japão, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Israel e algumas nações europeias. Nos Estados Unidos, a brucelose está praticamente erradicada em animais domésticos, ocorrendo apenas em populações silvestres, com surtos pontuais de transmissão para bovinos. Na França, a doença está sob controle (Megid et al., 2020).

Uma vigilância regular e meticulosa é essencial para determinar a real situação da brucelose, especialmente em regiões com alta prevalência contínua. Fatores como a migração internacional de seres humanos e animais, bem como o comércio de produtos de origem animal, representam desafios adicionais para a propagação e o diagnóstico da doença em áreas não endêmicas. Além disso, até o momento, não há uma vacina altamente protetora, segura e eficaz disponível para bovinos ou seres humanos, o que representa um obstáculo adicional para o controle da brucelose (Khurana et al., 2021).

1.1.2 Caráter zoonótico de *Brucella abortus* no contexto de uma só saúde

A brucelose é uma doença zoonótica que compromete o bem-estar animal e causa inúmeras implicações econômicas em todo o mundo. O surgimento da

brucelose em novas áreas, bem como a transmissão dessa doença entre animais selvagens e domésticos, é de grande importância em termos de novas dimensões epidemiológicas. Essa doença representa uma grande ameaça à saúde pública devido ao consumo de leite não pasteurizado e seus derivados produzidos por fazendas leiteiras de áreas endêmicas (Khurana et al., 2021).

A segurança alimentar tem relevante importância para a saúde pública. Inúmeras nações investem na identificação de perigos microbiológicos nos alimentos, nos fatores de risco para sua presença e nas formas de sua mitigação, uma vez que as enfermidades de origem alimentar são extremamente negligenciadas e subnotificadas. Como consequência dessa subnotificação, não se conhece a real situação dessas doenças em nível global (Kobayashi et al., 2017).

Em conformidade com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2009), faz-se necessário melhorar o monitoramento e a vigilância a fim de demonstrar que muitas doenças de origem alimentar são zoonóticas, como é o caso da brucelose. Dessa forma, atividades de prevenção e controle das zoonoses de origem alimentar são essenciais (Kobayashi et al., 2017).

A presença de patógenos de origem alimentar e agentes zoonóticos em alimentos artesanais produzidos a partir de leite não pasteurizado é motivo de preocupação para produtores, consumidores e serviços oficiais de fiscalização. A avaliação da segurança dos produtos artesanais é obrigatória, exigindo a fiscalização adequada das agroindústrias produtoras e o estabelecimento de diretrizes apropriadas para a produção, garantindo, assim, a segurança dos consumidores, principalmente porque esse tipo de alimento é muito procurado.

No caso de *Brucella*, a contaminação do queijo ou de outros produtos lácteos pode ocorrer em alguma das etapas da produção artesanal de queijos, iniciando pelo leite não pasteurizado obtido de animais potencialmente infectados, pelo ambiente de ordenha e durante a produção (Andretta et al., 2019).

A transmissão de *Brucella* pode ocorrer de duas maneiras principais: horizontal e vertical. Ambas são relevantes para a propagação da brucelose, tanto em populações animais quanto em seres humanos. No útero de animais gestantes, são encontradas maiores concentrações de *Brucella*. A principal fonte de infecção está nos fetos abortados, nas membranas placentárias e nas secreções uterinas. Vacas infectadas podem eliminar esse patógeno no leite e transmitir a infecção ao recém-nascido (Khurana et al., 2021).

O microrganismo pode sobreviver no ambiente por meses, especialmente em meios frios e úmidos. Os animais contraem a infecção pela ingestão de alimentos e água contaminados ou pelo contato com fetos abortados, membranas fetais e secreções uterinas (Khurana et al., 2021).

A brucelose humana é frequentemente causada por *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis* em todo o mundo. Ovinos, caprinos e seus produtos são as principais fontes de infecção por *B. melitensis*, que é a espécie mais patogênica para seres humanos, embora ainda não tenha sido notificada no Brasil (Khurana et al., 2021).

Em seres humanos, a brucelose é reconhecida como uma doença ocupacional que pode acometer produtores de leite, trabalhadores da ordenha, manipuladores de animais, trabalhadores da indústria de laticínios e de abate, empregados domésticos, açougueiros, caçadores, pastores, pessoal de laboratório, assistentes veterinários, cientistas e veterinários (Khurana et al., 2021).

Mesmo nos Estados Unidos, o consumo de produtos lácteos não pasteurizados continua sendo um problema de saúde pública. O risco de surtos tem sido intensificado devido à venda legal intraestadual de produtos lácteos não pasteurizados, influenciada pelos supostos benefícios nutricionais ou outros efeitos positivos erroneamente atribuídos a produtos lácteos crus (Lager et al., 2012).

1.1.3 Fisiopatogenia da doença

A bactéria *B. abortus* pode persistir na glândula mamária e nos linfonodos supramamários. Nestes, pode-se visualizar, por meio de microscopia, a presença de inflamação caracterizada por linfócitos, neutrófilos, células epitelioides e, ocasionalmente, células de Langhans. Com o desenvolvimento da doença, pode haver atrofia do tecido glandular e fibrose (Megid et al., 2020).

Um estudo realizado por Silva et al. (2016) identificou uma amostra com a estirpe vacinal e, em razão disso, foi sugerido que a estirpe vacinal B19 é excretada através do leite de vaca. Dessa forma, a possibilidade de eliminação intermitente da cepa B19 pode ocorrer no leite até que o animal complete nove anos de idade, com aumento dessa eliminação nos períodos de cio, até 150 dias de gestação e no pós-parto (Silva et al., 2016). Os impactos dessa eliminação na saúde do consumidor precisam ser melhor estudados, uma vez que outra cepa vacinal, a RB51, tem causado surtos de ampla magnitude nos EUA.

O úbere infectado pode parecer normal; no entanto, é uma importante fonte de infecção uterina e pode transmitir a doença a humanos e bezerros. O principal fator de contágio da brucelose é o abortamento, pois, em cada episódio, são eliminadas entre 10^{12} e 10^{13} bactérias viáveis, capazes de infectar de 60.000 a 600.000 gestantes. Em bovinos infectados, a quantidade de microrganismos eliminados tende a diminuir à medida que ocorrem novos partos (Megid et al., 2020).

1.1.4 Situação epidemiológica no Brasil e no estado de Minas Gerais

A brucelose é reconhecida como uma doença emergente desde a descoberta de seu principal agente clinicamente importante em humanos, *B. melitensis*, considerada a zoonose bacteriana de maior prevalência mundial, causando mais de 500.000 novos casos anuais em seres humanos. A brucelose humana ocorre com maior frequência em países em desenvolvimento, estando relacionada à pobreza rural e ao acesso inadequado à atenção à saúde (Novelli et al., 2020).

Com base nas formas de transmissão pelo contato, ingestão ou inalação de materiais biológicos oriundos de animais infectados por *Brucella*, a doença em humanos é endêmica e frequentemente associada a atividades econômicas ligadas à criação e ao comércio de rebanhos bovinos, suínos, caprinos e ovinos. Além disso, o nível socioeconômico e os hábitos alimentares das populações influenciam a disseminação da doença (Santana et al., 2020).

De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), as prevalências de animais e de focos de brucelose em Minas Gerais, relatadas em um estudo realizado em 2002, foram de 1,09% e 6,04%, respectivamente. Já em um segundo estudo, realizado em 2011, as prevalências foram de 0,81% e 3,59%, respectivamente. Portanto, observa-se uma redução na prevalência, considerando como referência o primeiro levantamento (MAPA, 2006).

A brucelose é uma zoonose notificada em vários estados brasileiros e, a partir de 2018, o estado de Minas Gerais, por meio da Resolução SES/MG Nº 6.532, incluiu a brucelose humana na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória, por ser uma enfermidade de interesse estadual (Minas Gerais, 2018).

Um estudo realizado pela Coordenação de Zoonoses e Vigilância de Fatores de Risco Biológicos no estado de Minas Gerais analisou a situação epidemiológica da brucelose humana na região. Foram identificados 84 pacientes notificados como

suspeitos, dos quais 72,62% (61/84) eram do sexo masculino, representando 71,79% dos pacientes confirmados (28/39). Esses percentuais estão relacionados ao principal grupo populacional acometido pela doença, que inclui trabalhadores rurais, funcionários de abatedouros e médicos veterinários que trabalham com animais de produção, os quais são os principais portadores da infecção animal, conforme descrito na literatura sobre a doença (Minas Gerais, 2023).

A brucelose também pode ser transmitida pelo consumo de produtos de origem animal que não passaram por tratamento térmico capaz de eliminar a bactéria, bem como pelo contato do material contaminado com mucosas e feridas, possibilitando a infecção de pessoas de ambos os sexos e de áreas urbanas e periurbanas (Minas Gerais, 2023).

A fabricação do queijo minas artesanal (QMA) utiliza leite cru, recém-ordenhado, com a adição de um soro fermento endógeno chamado “pingo”. Portanto, o QMA pode veicular patógenos zoonóticos, como *Brucella*. Esse patógeno pode ser eliminado no leite de bovinos infectados e permanecer viável em produtos lácteos não pasteurizados, representando um risco à saúde dos consumidores (Silva et al., 2018).

Anualmente, uma elevada taxa de casos de brucelose humana é identificada, com aproximadamente 500.000 registros da doença no mundo. Uma revisão sobre perigos microbiológicos em leite cru e derivados apontou que quase todos os surtos humanos de doenças de origem alimentar em regiões desenvolvidas foram atribuídos ao consumo de queijos feitos de leite cru, sendo *Brucella* o quarto patógeno mais envolvido nesses surtos (Verraes et al., 2015). Essa relação entre o consumo de leite cru e a doença também foi observada no Brasil (Lemos et al., 2018).

A implementação de medidas rigorosas de controle sanitário é crucial para garantir a segurança dos alimentos e evitar riscos microbiológicos associados ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados, como os queijos artesanais feitos de leite cru. A brucelose e a tuberculose bovina são duas das principais doenças zoonóticas que podem ser transmitidas ao ser humano pelo consumo de leite cru e seus derivados. Essas medidas são essenciais para aumentar a segurança dos queijos artesanais feitos de leite cru, uma vez que a matéria-prima não passa por pasteurização ou outro processo térmico que reduza a carga de possíveis patógenos a um nível aceitável (Silva et al., 2018).

1.1.5 Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal – (PNCEBT)

O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal – (PNCEBT) tem como estratégia de atuação a classificação das unidades federativas quanto ao grau de risco para essas doenças e a definição e aplicação de procedimentos de defesa sanitária animal, com base na classificação de risco de cada estado (MAPA, 2006).

Entretanto, o Brasil possui enormes dimensões continentais e, por isso, existem diferenças nas prevalências da brucelose entre as unidades federativas e dentro das mesmas, com destaque para as diferenças socioeconômicas, de extensão territorial, de rebanhos, de características de produção e de índices vacinais (MAPA, 2006).

Em razão disso, essas particularidades acarretam dificuldades no estabelecimento de uma estratégia única que seja adequada à realidade de todas as UF. Por isso, cada unidade da federação deve adotar medidas próprias para o controle e erradicação da brucelose. Com base no grau de risco para brucelose animal, as UF foram classificadas pelo Departamento de Saúde Animal - DSA, conforme a prevalência de focos em classes: A (< 2), B ($> 2 < 5$), C ($> 5 < 10$), D (> 10) e E (desconhecida) (MAPA, 2006).

Dessa forma, foi proposto um conjunto de medidas sanitárias compulsórias e medidas de adesão voluntária para as propriedades que possuem rebanho bovino e bubalino. O programa elenca as medidas compulsórias, que consistem na vacinação de bezerras bovinas e bubalinas entre 3 e 8 meses de idade contra a brucelose e a exigência de exames negativos para trânsito interestadual e para participação de animais em eventos pecuários (MAPA, 2006).

Em contrapartida, o programa inova trazendo medidas voluntárias, que consistem na certificação de propriedades livres de brucelose ou de tuberculose. Os produtores que pretendem produzir QALC seguro para o consumidor precisam buscar a certificação de suas propriedades como livres de brucelose ou de tuberculose, conforme estabelecido na Lei do Selo Arte (13.860/2019), regulamentada pelo Decreto Nº 11.099/2022. A referida lei estabelece que a elaboração de queijos artesanais a partir de leite cru fica restrita a queijarias situadas em estabelecimentos rurais, sendo necessário o certificado como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com as normas do PNCEBT, ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual

de defesa sanitária animal, no prazo de até 3 (três) anos a partir da publicação desta legislação. A certificação de estabelecimento de criação livre de brucelose ou de tuberculose deve ser formalmente solicitada à unidade local do serviço veterinário estadual, na qual o estabelecimento de criação se encontra cadastrado. O certificado de livre de brucelose ou de tuberculose será emitido pelo serviço veterinário estadual e terá validade nacional.

Além disso, para obter a certificação de estabelecimento de criação livre, é necessária a realização de dois testes de rebanho negativos consecutivos para brucelose e/ou para tuberculose, com intervalo de 6 a 12 meses. A manutenção do certificado de estabelecimento de criação livre de brucelose ou de tuberculose fica condicionada à realização e apresentação ao serviço veterinário oficial de testes de rebanho negativos com intervalos máximos de doze meses.

Portanto, o diagnóstico da doença é parte fundamental para o cumprimento do programa PNCEBT, e os métodos de detecção direta são necessários para a confirmação dos focos do surto e para a identificação da cepa. Mesmo em países onde as formas da doença foram erradicadas, a vigilância sanitária contínua é de extrema importância para prevenir a reintrodução da doença (Miyashiro et al., 2007).

1.2 QUEIJOS ARTESANAIS

1.2.1 Histórico do Queijo Artesanal em MG

Desde o século XVIII, o Queijo Minas Artesanal é fabricado em Minas Gerais, e o consumo desse alimento ultrapassa os limites do território mineiro. A forma de elaboração desse tipo de queijo foi tombada como patrimônio imaterial brasileiro, em razão de sua importância como valor cultural para o povo mineiro. Desde então, tornou-se um desafio investigar suas origens históricas e geográficas, bem como a identidade das regiões queijeiras, onde é produzido há cerca de três séculos (Netto et al., 2011).

A região da Canastra é uma das mais conhecidas pela produção do queijo artesanal em Minas Gerais, e sua reputação ultrapassa os limites do Estado. O nome Canastra, do grego *kanastron* e do latim *cannastrum*, significa recipiente, em virtude de sua semelhança entre o imenso chapadão e um grande baú, e antigamente as pessoas mais velhas a chamavam de "canastra" (Netto et al., 2011).

Naquela região, algumas famílias possuíam o conhecimento sobre a produção do queijo elaborado a partir do leite fresco, identificando assim um ambiente adequado para continuar a arte de produzir queijos artesanais. Posto isso, a região da Canastra tem na produção do queijo artesanal um valor cultural de relevada importância socioeconômica para as famílias rurais, uma vez que nela se destaca a presença da agricultura familiar, com sua característica de produção de diferentes produtos e seu envolvimento na atividade leiteira (Netto et al., 2011).

Portanto, o queijo artesanal e outros produtos eram produzidos e consumidos pelas famílias, sendo comercializados por tropeiros que passavam pela região e, posteriormente, distribuíam esses produtos para diversas comarcas. A produção de queijo é uma atividade que carrega consigo muita história, e as famílias viam na fabricação do queijo uma alternativa de renda e de sobrevivência (Netto et al., 2011).

O estado de Minas Gerais é conhecido nacionalmente pela produção de queijos com características e identidade próprias, sendo impossível medir rigorosamente o valor cultural e econômico das fazendas queijeiras. De acordo com o Relatório de 2022 do Sistema Safra Agroindústria da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (Emater MG), Minas Gerais possui 3.089 agroindústrias produtoras de Queijo Minas Artesanal (QMA), com produção estimada em 21,8 mil toneladas por ano (Emater MG, 2022) (Costa et al., 2022).

Assim, Minas Gerais é um dos maiores produtores de queijos artesanais do Brasil, com destaque para o Queijo Minas Artesanal (QMA), que tem como principal característica o uso de matéria-prima crua e o acréscimo de um soro fermento natural. Atualmente, o estado de MG conta com dez regiões produtoras de QMA oficialmente reconhecidas: Araxá, Campos das Vertentes, Cerrado, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Serras da Ibitipoca, Diamantina e Entre Serras da Piedade ao Caraça (Costa et al., 2022).

1.2.2 Legislação Relacionada ao Queijo Artesanal no Brasil e no Estado de MG

A legislação federal sobre queijo artesanal no Brasil inclui o Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022, que regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, estabelecendo o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. A Lei nº 13.680, de 14

de junho de 2018, alterou a Lei nº 1.283/1950 e estabelece como se dá esse processo de fiscalização.

O artigo 10-A, cujo texto foi atualizado, determina que a comercialização interestadual de produtos alimentícios fabricados de forma artesanal deve preservar características e métodos tradicionais ou regionais próprios, cumprir um plano de boas práticas agropecuárias e de fabricação, além de estar sujeita à fiscalização dos órgãos de saúde pública dos estados e do Distrito Federal.

Em relação à identificação do produto artesanal, este deve ser reconhecido em todo o território nacional com um selo único contendo a inscrição "ARTE", conforme o regulamento vigente. Além disso, o estabelecimento e o produto artesanal devem ser registrados, com a devida classificação, controle e número de inspeção.

A Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, conhecida como Lei do Selo Arte, estabelece regras para a elaboração e comercialização de queijos artesanais. Essa norma define queijo artesanal como aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, de acordo com um protocolo de produção específico para cada tipo e variedade, além da exigência do cumprimento das boas práticas agropecuárias e de fabricação.

Essa legislação determina que o produtor artesanal é responsável pela identidade, qualidade e segurança sanitária do queijo que fabrica, devendo cumprir os requisitos sanitários estabelecidos pelo poder público. O tempo de cura do queijo feito a partir de leite cru é definido com base no processo tecnológico de produção de cada variedade de queijo e de acordo com suas características específicas.

A referida lei também estabelece que, para a elaboração de queijos artesanais a partir de leite cru, a queijaria situada em estabelecimento rural deve possuir certificação de "livre de tuberculose e brucelose", conforme as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), ou ser monitorada pelo órgão estadual de defesa sanitária animal, no prazo de até três anos a partir da publicação da legislação.

A Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, regula a produção e comercialização dos queijos artesanais em Minas Gerais e determina que a maturação do QMA deve ser realizada em temperatura ambiente, em ambiente climatizado ou em área subterrânea, na própria queijaria ou em entreposto, sendo vedada a maturação em temperatura de refrigeração.

Com base no Decreto Estadual nº 42.645, de 5 de junho de 2002, as agroindústrias produtoras de QMA devem utilizar leite fresco de rebanhos livres de brucelose. A norma do estado de Minas Gerais não determina explicitamente a busca direta de *Brucella* no QMA, apesar da relevância dessa doença zoonótica para a saúde pública. No estado, o controle da brucelose baseia-se na vacinação de bezerras e na realização de exames nos animais (Silva et al., 2018).

Dessa forma, agroindústrias autorizadas a vender QMA em outros estados devem possuir certificação de "livre de brucelose" como condição adicional. No entanto, essa certificação não garante imunidade permanente contra *Brucella*. Portanto, devem ser incentivadas medidas adicionais de controle para garantir a segurança dos produtos fabricados com leite não pasteurizado, como a maturação prolongada e o monitoramento contínuo da qualidade do leite durante o processamento dos queijos artesanais (Silva et al., 2018).

1.2.3 Procedimentos de fabricação do queijo artesanal

Os queijos artesanais são produzidos com leite integral fresco não pasteurizado e possuem características marcantes de sabor e textura, que os tornam produtos especiais, não apenas para consumo direto, mas também como ingredientes em pratos sofisticados da gastronomia brasileira. O queijo artesanal é rico em sabores e texturas e é objeto de pesquisa devido à sua importância econômica e social para as regiões onde é produzido (Sobral et al., 2022).

A produção de queijos artesanais destaca as tradições culturais do estado de Minas Gerais, uma vez que a tecnologia de fabricação é transmitida de geração em geração, de pai para filho. Os queijos artesanais são fabricados considerando as características típicas da região, como o modo de fazer, além de fatores como clima, ambiente e pastagem. O tipo de alimentação fornecida ao animal influencia diretamente na composição do leite cru e na microbiota autóctone, presente não apenas no leite, mas também no ambiente, conferindo sabores e texturas específicas ao queijo artesanal (Sobral et al., 2022).

A produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) ocorre na propriedade de origem do leite, em microrregiões do estado de Minas Gerais reconhecidas por sua produção tradicional e por procedimentos próprios. A fabricação deve ser realizada com leite cru integral, em até 90 minutos após o início da ordenha, com adição de fermento natural

endógeno e coagulação com quimosina de bezerro, devendo posteriormente ser prensado manualmente (Mussi et al., 2018).

Cada microrregião do estado de Minas Gerais produz o QMA com características sensoriais peculiares e distintas, como sabor que varia de brando a ligeiramente ácido, consistência de semidura a mais macia, odor mais forte ou mais sutil. Essas características resultam da combinação de fatores como solo, pastagem, clima, altitude, água e raça do rebanho leiteiro das regiões produtoras, os quais influenciam diretamente na composição e microbiota desse leite. Assim, o leite cru utilizado nessa produção contém bactérias específicas, provenientes da água, do solo e do fermento natural, que se multiplicam e conferem aparência e sabor característicos aos queijos de cada microrregião (Mussi et al., 2018).

A produção do QMA tem como característica principal o uso de leite não pasteurizado e do "pingo". O pingo é um tipo de fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados, coletado de um dia para o outro. Esse soro fermentado, com uma determinada quantidade de sal, atua como um iniciador da fermentação, conferindo ao queijo características exclusivas de sua variedade.

A composição do pingo varia conforme a região produtora, contendo diversos tipos de microrganismos, como bactérias ácido-láticas (BAL) dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., além de bolores e leveduras. Essa rica microbiota influencia diretamente a consistência, o sabor, a coloração e as olhaduras do queijo, aspectos intimamente ligados à tradição histórica e cultural de cada microrregião onde ele é produzido (Mussi et al., 2018).

Diante disso, o estado de Minas Gerais deve documentar o processo de produção dos diferentes tipos de queijos artesanais, a fim de proteger esse patrimônio histórico e cultural. Além disso, é fundamental oferecer apoio aos produtores, promovendo capacitação, assistência tecnológica e financiamento, para aprimorar a gestão e os processos produtivos. Dessa forma, torna-se essencial a delimitação de regiões produtoras de queijos artesanais, garantindo a padronização da identidade e qualidade de cada variedade, normatizando as condições de fabricação e viabilizando sua comercialização dentro e fora do estado (Sobral et al., 2022).

1.2.4 Período de maturação do queijo artesanal e relação com sobrevivência de *Brucella abortus*

A maturação do queijo artesanal é um processo complexo, no qual a microbiota do queijo metaboliza componentes como gordura, proteína e carboidratos, levando a modificações bioquímicas, físicas e microbiológicas ao longo do tempo. Essas transformações são essenciais para o desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do queijo (Mussi et al., 2018).

Essas modificações bioquímicas, geradas pela ação de enzimas, microrganismos e condições adequadas de temperatura e umidade, ocorrem em diferentes fases da maturação. Inicialmente, há o metabolismo da lactose e citrato, seguido por processos como proteólise e lipólise. Posteriormente, acontecem reações bioquímicas mais complexas, como o catabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, diacetil e ácido láctico. Durante essas reações, são liberados metabólitos como aminoácidos, ácidos graxos, diacetil, dióxido de carbono, tioésteres, cetoácidos, tióis, lactonas, ésteres lipídicos, aminas, amônia, etanol e ácidos orgânicos, incluindo o láctico, acético e propiônico, que influenciam nas características sensoriais do queijo, como sabor, textura, cor e odor (Mussi et al., 2018).

No início da maturação, ocorrem modificações microbiológicas, com a presença de microrganismos iniciadores. À medida que o processo avança, há uma redução da atividade da água, um aumento do teor de NaCl e um incremento na atividade hidrolítica das enzimas microbianas. Esse conjunto de fatores contribui para o controle da atividade metabólica e da multiplicação dos microrganismos iniciadores, preparando o ambiente para o desenvolvimento da microbiota secundária (Mussi et al., 2018).

A Portaria do IMA nº 2051, de 07 de abril de 2021, estabelece os períodos mínimos de maturação do Queijo Minas Artesanal (QMA) produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro, com base em estudos científicos. O período mínimo de maturação é de 14 (quatorze) dias para as microrregiões de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, de 17 (dezessete) dias para a microrregião do Serro e de 22 (vinte e dois) dias para as demais regiões do estado, independentemente de serem caracterizadas como produtoras de QMA (IMA, 2021). Entretanto, esses prazos precisam ser revistos periodicamente, pois refletem a dinâmica dos microrganismos e patógenos presentes

no momento da avaliação, a qual pode ser influenciada por mudanças nas práticas de higiene ou pela introdução e reintrodução de patógenos em cada região.

A fabricação do queijo é realizada com leite não pasteurizado, o que pode possibilitar a transmissão de patógenos zoonóticos, como *Brucella* spp. Esse microrganismo patogênico pode ser eliminado diretamente no leite de bovinos infectados e permanecer viável em produtos lácteos não pasteurizados, representando um risco para a saúde dos consumidores (Silva et al., 2018).

Dessa forma, considerando que o queijo é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil, é essencial que sua produção siga rigorosamente os padrões higiênico-sanitários estabelecidos pelas normas vigentes. Além disso, o leite utilizado como matéria-prima deve ser proveniente de animais criados em condições sanitárias adequadas, a fim de evitar a transmissão de microrganismos patogênicos por meio dos alimentos. Dentre esses patógenos, destacam-se as bactérias do gênero *Brucella*, que podem ser eliminadas por períodos prolongados no leite de vacas infectadas (Silva et al., 2016).

1.3 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM REBANHOS

1.3.1 Sorologia no leite do rebanho

O Teste do Anel em Leite (TAL) é uma adaptação do teste de aglutinação, no qual se utiliza uma mistura de leite com células inteiras de *Brucella* coradas com hematoxilina. Se houver anticorpos no leite, uma parte deles se ligará aos glóbulos de gordura por meio da fração Fc (fixadora de complemento) dos anticorpos (Megid et al., 2020).

Esses anticorpos irão se ligar ao antígeno e, como os glóbulos de gordura se acumulam na superfície do leite, formará um anel azul no topo da coluna de leite. Caso não haja formação do anel na superfície, significa que não há presença de anticorpos. O objetivo do teste é detectar rebanhos infectados, sendo um teste de triagem, sem valor para diagnóstico individual. Para a identificação de rebanhos infectados, deve-se realizar o exame dos animais de forma individual, por meio da pesquisa de anticorpos realizada em amostras de sangue (Megid et al., 2020).

1.3.2 Sorologia em indivíduos

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) aprovou dois grupos de testes para o diagnóstico da brucelose. O primeiro grupo inclui o teste com antígeno acidificado tamponado (AAT) e o Teste do Anel em Leite, que são utilizados como provas de rotina e devem ser realizados por médicos veterinários habilitados, mediante curso aprovado pelo MAPA. O segundo grupo compreende os testes de 2-mercaptoetanol e de fixação de complemento, empregados para a confirmação da brucelose, podendo ser realizados em laboratórios oficiais credenciados pelo MAPA. O diagnóstico da brucelose pode ser realizado em machos e em fêmeas não vacinadas com idade superior a oito meses, assim como em fêmeas vacinadas com a B19, desde que tenham mais de 24 meses de idade (Lage et al., 2008).

O exame sorológico baseia-se na reação entre antígenos de *Brucella* spp. – células inteiras inativadas ou suas frações purificadas – e anticorpos produzidos como resposta a uma infecção. As bactérias do gênero *Brucella* podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucóide). Essa morfologia está associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo da parede celular e, para algumas espécies, pode estar relacionada à virulência. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* normalmente apresentam uma morfologia de colônia do tipo lisa; no entanto, quando evoluem para formas rugosas ou mucóides, perdem a capacidade patogênica. Embora bovinos e bubalinos sejam suscetíveis a *B. suis* e *B. melitensis*, a espécie mais relevante é *B. abortus*, responsável pela maioria das infecções (MAPA, 2006).

Com base no PNCEBT, as vacinas utilizadas para o controle da brucelose são a B19 e a RB51, ambas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A vacina B19, por ser derivada de uma amostra lisa de *B. abortus*, induz a formação de anticorpos específicos contra o lipopolissacarídeo liso (LPS), o que pode interferir no diagnóstico sorológico da brucelose. A persistência desses anticorpos está relacionada à idade da vacinação. Em fêmeas vacinadas com mais de oito meses de idade, há uma alta probabilidade de produção de anticorpos persistentes, o que pode comprometer o diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Por outro lado, quando a vacinação ocorre antes dos oito meses de idade, há uma rápida redução

dos anticorpos, sem interferência nos testes realizados em fêmeas acima dos 24 meses (MAPA, 2006).

A vacinação com a B19 é recomendada para fêmeas entre três e oito meses de idade. Nesse processo, as imunoglobulinas da classe IgM aparecem no soro por volta do quinto dia, enquanto as imunoglobulinas da classe IgG surgem simultaneamente ou poucos dias depois. O pico de IgM ocorre por volta do 14º dia e, posteriormente, sua concentração diminui. Já as IgG atingem o valor máximo entre 28 e 42 dias e, após esse período, também desaparecem. Assim, a idade do animal influencia no momento da vacinação, pois quanto mais avançada for a idade, mais prolongado será o período necessário para a eliminação dos anticorpos (Lage et al., 2008).

Dessa forma, é fundamental respeitar o período de vacinação de fêmeas entre três e oito meses de idade, para evitar interferências em levantamentos epidemiológicos voltados à identificação da distribuição de indivíduos infectados por amostras de campo de *Brucella*, evitando, assim, confusões com a resposta vacinal.

1.3.3 Isolamento de *Brucella*

O isolamento de *Brucella* pode ser realizado a partir de diferentes tipos de materiais, como, por exemplo, feto abortado, placenta ou leite. No feto, deve-se coletar material estomacal, pulmões e fígado; na placenta, o exsudato uterino; e, no leite, é necessário centrifugá-lo e, após homogeneização, utilizar o sedimento e o sobrenadante para o diagnóstico (Megid et al., 2020).

Para a realização do isolamento, pode-se semear o material diretamente em meio de cultura ou inoculá-lo em animais de laboratório, sendo a cobaia a mais utilizada para esse tipo de estudo. Contudo, tendo em vista a preocupação com o bem-estar animal, há uma tendência em optar pelo uso de técnicas in vitro (Megid et al., 2020).

O leite deve ser coletado de forma asséptica e a amostra deve conter a mistura dos quatro quartos, com aproximadamente 20 mL de cada teto (Lages et al., 2008). É importante destacar que bovinos infectados durante o período gestacional apresentam maior ocorrência de isolamento de *Brucella* no leite após o aborto. Contudo, o aborto não influencia a infecção dos linfonodos e tecidos mamários desses animais (Mussi et al., 2018).

1.3.4 Técnicas baseadas em PCR

O estudo de ácido nucleico pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem ganhado espaço na identificação de *Brucella*, permitindo a detecção da bactéria diretamente em material coletado do animal. Essa técnica apresenta inúmeras vantagens quando comparada ao isolamento do agente etiológico, pois é de execução mais rápida, exige menor trabalho manual, pode ser automatizada e não expõe o manipulador ao risco de infecção (Megid et al., 2020).

Diversas técnicas de PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico dessa bactéria. Dependendo da finalidade, uma técnica gênero-específica pode ser suficiente e tende a ser mais simples. Os principais alvos genéticos desse tipo de técnica são o gene BCSP 31 e a sequência intergênica entre os genes 16S e 23S do rRNA (RNA ribossômico) de *Brucella* (Megid et al., 2020).

Cabe destacar um estudo no qual foi utilizada a Nested-PCR direcionada ao gene EryD, que é complementar nas linhagens de *Brucella* (Silva et al., 2018). Em outros tipos de estudo, pode ser necessária a identificação da espécie envolvida, inclusive do biovar. Nesses casos, as técnicas são mais desafiadoras e são rotineiramente utilizadas em pesquisas (Megid et al., 2020).

1.4 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *BRUCELLA ABORTUS* EM QUEIJO ARTESANAL

1.4.1 Técnica molecular – PCR (convencional, nested e tempo real)

Tradicionalmente, o diagnóstico da brucelose é realizado com base no isolamento da bactéria *Brucella*, sendo este método reconhecido como padrão-ouro para a identificação dessa bactéria. Entretanto, para o isolamento de *Brucella* spp., são necessários inúmeros dias para a identificação do agente, devido à baixa sensibilidade desse método, o que consome, além de tempo, muitos recursos (Yu et al., 2010). Além disso, o fato de esse patógeno ser considerado de alto risco biológico contribui para o aumento dos custos, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados, instalações e equipamentos de proteção de nível 3 de biossegurança (Sola et al., 2014).

Diante das dificuldades apresentadas pelo método de cultivo, a PCR se apresenta como uma alternativa para a detecção de *Brucella*. Uma revisão de 2010 destacou 400 estudos em que foram utilizados diversos métodos baseados em PCR para a detecção dessa bactéria (Yu et al., 2010). No Brasil, mesmo com a devida importância da brucelose bovina, existem alguns estudos voltados à investigação dos diferentes biovars de *Brucella* entre bovinos, como o de Miyashiro et al. (2007).

Outro estudo nacional foi realizado para a detecção de biovars de *Brucella* em rebanhos bovinos e sua identificação molecular por PCR, sendo que, nesse estudo, a PCR foi utilizada para detectar os biovars de *Brucella* em rebanhos bovinos de diferentes regiões do Brasil (Carvalho et al., 2011).

Seguindo essa mesma linha, outro estudo buscou validar um protocolo de multiplex PCR para a identificação e diferenciação das espécies de *Brucella* (por exemplo, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis*) em amostras clínicas, com avaliação da sensibilidade e especificidade do método (Orzil et al., 2016). A pesquisa reafirma que a multiplex PCR é uma ferramenta eficaz para a detecção e identificação de *Brucella* spp., com potencial para substituir ou complementar métodos tradicionais em ambientes laboratoriais e clínicos.

Finalmente, um estudo utilizou a aplicação da PCR em tempo real para a detecção de *Brucella* em bovinos no Brasil (Gonzalez et al., 2014). Esse estudo discute o uso da PCR em tempo real para a detecção de *Brucella* em amostras de bovinos, incluindo a identificação de diferentes biovars da bactéria.

Outra tendência tem sido o uso da PCR para detectar *Brucella* em leite e derivados, dada a já mencionada baixa sensibilidade do cultivo para o isolamento desse patógeno em alimentos. Um estudo utilizou a técnica de PCR para detectar *Brucella* spp. em amostras de queijo de origem clandestina nos estados de São Paulo e Minas Gerais. O patógeno foi detectado por PCR, mas sem sucesso na tentativa de isolamento por cultura. A amplificação por PCR identificou a presença de *Brucella* spp. em 13,16% das amostras de queijo analisadas (Kobayashi et al., 2017).

Outro estudo analisou a presença de *B. abortus* em laticínios não regularizados dos estados de São Paulo e Minas Gerais, comparando os resultados obtidos por meio de PCR e cultura microbiológica. Nesse estudo, foi desenvolvida uma reação de PCR semi-nested adequada para a diferenciação da cepa vacinal B19 das demais cepas de campo de *Brucella* em amostras de queijos naturalmente contaminados. Nenhum microrganismo foi isolado por cultura. No entanto, a PCR detectou um total

de 37 amostras positivas (19,27%), utilizando primers específicos para o gênero. Dentre essas, 18,92% eram cepas de campo e 81,08% eram amostras vacinais. A PCR foi 100% eficiente na detecção de *B. abortus*, indicando que todas as amostras positivas correspondiam a essa espécie bacteriana (Miyashiro et al., 2007).

Além disso, as técnicas baseadas em PCR podem ser utilizadas para a diferenciação de espécies e na biotipagem de isolados. O genoma de *Brucella* possui algumas sequências curtas de repetições de nucleotídeos, apresentando grande variação no número de repetições entre espécies e isolados. A utilização da PCR para amplificar essas repetições variáveis é mais robusta do que os métodos clássicos de tipagem para a identificação de espécies e biovars (Christopher et al., 2010).

Em resumo, a técnica de PCR tem sido aplicada para a identificação da contaminação por *Brucella* spp. em alimentos, especialmente leite e queijos frescos, além de tecidos e secreções animais. Essa técnica demonstrou ser altamente sensível e pode ser utilizada desde que se disponha de grandes volumes de amostras. Além disso, a técnica do Anel no Leite (TAL), juntamente com a PCR, demonstrou ser um excelente método diagnóstico para a presença de *Brucella* spp. no leite (Paula et al., 2015), evidenciando que o uso combinado de duas técnicas pode ser estratégico.

A técnica Nested PCR é uma abordagem aprimorada da PCR convencional, que visa aumentar a sensibilidade e a precisão do diagnóstico. O uso de dois pares de primers em duas etapas de amplificação, sendo o segundo par localizado dentro da região amplificada pelo primeiro, permite a detecção de baixos níveis de DNA-alvo e reduz a amplificação de produtos inespecíficos. Esse método tem se mostrado eficaz, especialmente em situações em que há baixa quantidade de material genético da bactéria *Brucella*, como em infecções subclínicas ou quando as amostras são difíceis de processar (Izadi et al., 2014).

Um estudo demonstrou a maior sensibilidade da técnica Nested PCR na identificação de *Brucella*, o que é especialmente relevante em contextos epidemiológicos ou clínicos, em que a infecção está em estágios iniciais ou a carga bacteriana é baixa. Essa técnica é fundamental para isolar e identificar com precisão os biovars de *Brucella*, contribuindo para a melhoria dos métodos diagnósticos da brucelose (Izadi et al., 2014).

A PCR em tempo real foi desenvolvida com as vantagens de ser realizada em tempo reduzido, dispensar a análise eletroforética e diminuir a contaminação. Podem ser utilizadas células de *Brucella* cultivadas, soro, sangue e tecidos em parafina. Além

disso, a PCR em tempo real pode ser empregada para o diagnóstico da brucelose humana, permitindo identificar estados inativo, soropositivo e ativo quando utilizada em amostras de soro de pacientes com quadro clínico conhecido (Yu et al., 2010).

Entretanto, antes da realização de qualquer tipo de PCR, é fundamental realizar a extração do material genético, pois essa é uma etapa crítica para qualquer PCR. Para que essa etapa impacte positivamente as PCRs subsequentes, é necessário utilizar protocolos padronizados ou kits comerciais. Nesse sentido, um estudo sobre a detecção de *Brucella* desenvolveu um método aprimorado para a purificação do DNA bacteriano a partir do leite bovino para a detecção de *Brucella* por PCR. O protocolo citado utilizou um tampão de lise com altas concentrações de trishidroximetilaminometano, ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico desidratado (EDTA), cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio e proteinase K, além de uma alta temperatura de incubação para a extração eficiente do DNA de *Brucella*. A sensibilidade da PCR foi de 5 a 50 unidades formadoras de colônias de *Brucella* (UFC)/mL de leite. Esse método de extração ajudou a melhorar a eficácia dos testes, aumentando a sensibilidade do diagnóstico, o que é crucial para o controle da brucelose nos rebanhos (Yu et al., 2010).

A brucelose bovina é endêmica no Brasil e em Minas Gerais. Neste estado, existe um queijo artesanal, o QMA, que é produzido a partir de leite cru. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a prevalência de *Brucella* spp. em QA de diferentes regiões do estado de Minas Gerais e em uma região do Piauí, bem como os fatores de risco para a presença de *Brucella* spp. nos referidos queijos.

Desse modo, o presente estudo auxiliará, com bases científicas, na instituição de medidas de monitoramento e controle, além da construção de padrões relacionados aos QALC para apoiar os órgãos oficiais de vigilância nos setores de agricultura, saúde e meio ambiente. Os resultados deste estudo serão apresentados na forma de artigo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realização de estudos epidemiológicos para avaliação da presença de *Brucella* spp. em Queijo Artesanal de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e uma região do Piauí.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar a prevalência de *Brucella* spp. em Queijo Artesanal de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e de uma região do Piauí.

Identificar fatores de risco para presença de *Brucella* spp. em queijo artesanal de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e de uma região do Piauí.

REFERÊNCIAS

ANDRETTA, M. A. T. T.; FERREIRA L. R.; CARVALHO A. F.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A. Status de segurança microbiana do queijo artesanal Serro produzido no Brasil. **Journal Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10790-10798, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA, 2006.

BRASIL. Decreto nº 11.099, 21 de junho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 22 jun. 2022.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 15 jun. 2018.

BRASÍLIA. Lei nº 13.860, de 14 de junho de 2018. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 27 set. 2019.

CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Brucelose: revisão sobre as tendências recentes de patogenicidade e diagnóstico laboratorial. **Journal Laboratory Physicians**, v. 2, n. 2, p. 55-60, 2010.

COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D.; PAIVA, C. S.; RODRIGUES, R. F.; LIMA, M. S.; PAULA, J. C. J.; FONSECA, N. O.; SILVA, M. P.; BORGES, M. C. O.; MARTINS, M. S. Artisanal Minas cheeses – a brief review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022.

DARWISH, S. F.; ALLAM, H. A.; AMIN, A. S. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, 461-467, 2009.

IZADI, A.; MOSLEMI, E.; TABATABAEI PANAHI, A.; KHEIRI MANJILI, H. Detecção de *Brucella* spp em produtos lácteos utilizando técnicas de nested e hemi nested PCR. **Annals of Biological Research**, v. 5, p. 124-131, 2014.

KHURANA, S. K.; SEHRAWAT, A.; TIWARI, R.; PRASAD, M.; GULATI, B.; SHABBIR, M. Z.; CHHABRA, R.; KARTHIK, K.; PATEL, S. K.; PATHAK, M.; IQBAL YATOO, M.; GUPTA, V. K.; DHAMA, K.; SAH, R.; CHAICUMPA, W. Brucelose bovina - uma revisão abrangente. **Veterinary Quarterly**, v. 41, p. 61-88, 2021.

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F. D.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S. Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

LAGE, A. *et al.* Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 202 - 212, 2008.

LANGER, A. J.; AYERS, T.; GRAMA, J.; LYNCH, M.; ANGULO, F. J.; MAHON, B. E. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws-United States, 1993-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 385-391, 2012.

LEMOS, T. S. *et al.* Surto de brucelose humana no Sul do Brasil e revisão histórica de dados de 2009 a 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2018.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A. Brucelose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2020. p. 21-55.

MEURER, I. R. *et al.* Seroprevalence estimate and risk factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 3, p. 261-269, 2021.

MIYASHIRO, S. *et al.* Detection of *Brucella* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 17-22, 2007.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 2051, de 07 de abril de 2021**. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2021.

MINAS GERAIS. **RESOLUÇÃO SES/MG Nº 6.362, DE 08 DE AGOSTO DE 2018**. Estabelece procedimentos para o licenciamento sanitário do microempreendedor individual, do empreendimento familiar rural e do empreendimento econômico solidário, que exercem atividades de baixo risco sanitário na área de Alimentos, 2018.

MUSSI, J. M. S. **Efeito do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láticas e da maturação na sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos tipo Minas artesanal**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

NETTO, M. M. **A geografia do queijo Minas artesanal**. Tese - (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, São Paulo, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – FAO. **O estado da alimentação e da agricultura. Serviço de Gestão de Publicações da FAO**. Roma, p. 176, 2009.

ORZIL, L.; L. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp.. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 847-852, 2016.

PAULA, C. L.; MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C.M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF S. D.; MEGID, J. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 82, p. 1-5, 2015.

PIAO, D.; LI, Z; YANG, X.; TIAN, G.; ZHAO, H.; JIANG, H. Emerging Brucellosis Outbreaks Associated with Unpasteurized Milk in China. **China CDC Wkly**, v. 2, n. 26, p. 888-890, 2020.

ROCHA, K. P. C. *et al.* Utilização De Um Teste Elisa Indireto para o Diagnostico da Brucelose em Amostras de Soro de Búfalas. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 29, 2017.

ROZENTAL, T. *et al.* Primeira detecção molecular de *Coxiella burnetii* em queijo artesanal brasileiro: um risco negligenciado à segurança alimentar em produtos lácteos crus prontos para consumo. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 208-212, 2020.

SILVA, J. *et al.* *Brucella abortus* detected in cheese from the Amazon region: differentiation of a vaccine strain (B19) from the field strain in the states of Pará, Amapá and Rondônia, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 705-710, 2016.

SILVA, M. R. *et al.* Occurrence of *Brucella* in Minas artisanal cheese of Serro micro-region: an important public health problem. **Revista Médica de Minas Gerais**, 2018.

SILVA, M. R.; FERREIRA, F. C.; MARANHÃO, A. G.; LANZARINI, N. M.; CARVALHO, C. K. N.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of Viral Contamination of Five Brazilian Artisanal Cheese Produced from Raw Milk: a Randomized Survey. **Food and Environmental Virology**, v. 13, p. 528-534, 2021.

SOBRAL, D. *et al.* Queijos artesanais de Minas, nem todos são QMA: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, p. 55-67, 2022.

VERRAES, C. *et al.* A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32-44, 2015.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Revisão da detecção de *Brucella* spp. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 306-13, 2010.

**BRUCELLA EM QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU MINAS E COALHO
E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ESPACIAIS COM EXPOSIÇÕES HUMANAS
NO BRASIL: UM ROBUSTO ESTUDO TRANSVERSAL**

RESUMO

Introdução: A comercialização de queijos artesanais (QA) feitos de leite cru bovino é permitida em alguns países, incluindo o Brasil. Em Minas Gerais (MG), os modos de fazer QA foram considerados patrimônio histórico imaterial da humanidade pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Apesar dos esforços dos órgãos de fiscalização, ainda se observam muitos desafios, especialmente no que diz respeito à produção segura para a saúde do consumidor. Nesse sentido, é importante destacar alguns pontos que permanecem em discussão, como os patógenos zoonóticos mais prevalentes nos QA, os fatores de risco para sua presença nesse alimento e a distribuição espacial dos “rebanhos produtores de QA”, tendo em vista que esses produtos geralmente são feitos em “queijarias” na própria fazenda. Dentre os patógenos que podem ser veiculados pelo QA e que têm importância para a saúde pública — exigindo uma abordagem de Saúde Única — *B. abortus* apresenta uma posição de destaque. Dessa maneira, é fundamental a realização de estudos epidemiológicos para avaliar a presença e os principais fatores de risco associados a *B. abortus* em QA. **Material e Métodos:** Durante o período de outubro/2017 a abril/2018, foi realizado um levantamento randomizado com o objetivo de avaliar: i) a frequência de DNA de *Brucella* em queijos artesanais feitos de leite cru (QALC) de quatro regiões tradicionais do estado de Minas Gerais, que produzem o queijo Minas artesanal (QMA), e da região de Parnaíba, no estado do Piauí, que produz o queijo artesanal de coalho; ii) os fatores associados à contaminação dos QALC por *Brucella* spp.; iii) as relações de agrupamentos espaciais de QALC contaminados pelo agente bacteriano, considerando as características dos queijos, como o tempo de maturação e os resultados de análises microbiológicas para outros agentes bacterianos ou virais; iv) as possíveis relações entre os aglomerados de positividade para *Brucella* em QALC e as exposições humanas ao mesmo agente. O DNA de amostras fracionadas de QALC foi extraído usando o método tradicional de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *eryD*.

Possíveis associações dos QALC positivos para *Brucella* foram analisadas por meio de análises univariadas e análises espaciais, tanto para ARFPQ com QALC positivos quanto para exposições humanas a esse patógeno e concentrações de animais pecuários. **Resultados:** O fragmento parcial do gene *eryD* de *Brucella* spp. foi detectado e sequenciado em 33 amostras de QALC (33,0%; IC 95% 13,3%-68,4%), verificando-se uma heterogeneidade das taxas de queijos positivos entre as cinco regiões analisadas ($p = 0,04$). As taxas de queijos positivos para *Brucella* apresentaram relações lineares inversas com as taxas de positividade de queijos com tempo de maturação acima da mediana (10 dias) (Inclinação = -0,0053, $p = 0,0001$). A ocorrência de dois clusters de alta densidade por EDK para queijo artesanal de leite cru (RMAC) positivos para *Brucella* foi observada em agroindústrias de uma região produtora de queijo Minas artesanal, localizada em Minas Gerais, e em uma região produtora de queijo artesanal de coalho, no estado do Piauí. O cluster desta última região foi significativo por Scan ($p < 0,01$). **Conclusão:** Este estudo mostra que a contaminação de QALC por *Brucella* spp. pode representar um possível risco para o consumidor desses produtos, destacando a necessidade de boas práticas agropecuárias e de fabricação, bem como de sistemas de controle de qualidade dos QALC. Como uma pesquisa randômica, estabelecemos dados basais sobre a frequência de *Brucella* spp. em dois tipos de QALC brasileiros prontos para consumo. Essas informações são as primeiras a serem consideradas em um sistema de monitoramento de tendências temporais e espaciais e para o estabelecimento de metas de controle, além de futuros estudos sobre a análise de risco local.

Palavras-chave: *Brucella* spp.; brucelose, queijo Minas artesanal; queijo artesanal Coalho; maturação; nested PCR.

ABSTRACT

Introduction: The commercialization of artisanal cheeses (AQ) made from raw bovine milk is permitted in some countries, including Brazil. In Minas Gerais (MG), the ways of making AQ were considered intangible historical heritage of humanity by the National Historical and Artistic Heritage Institute (IPHAN). Despite the efforts of the inspection bodies, there are still many challenges, especially with regard to production that is safe for consumer health. In this sense, it is important to highlight some points that remain under discussion, such as the most prevalent zoonotic pathogens in QA, the risk factors for their presence in this food and the spatial distribution of “QA-producing herds”, given that these products are usually made in “cheese factories” on the farm itself. Among the pathogens that can be transmitted through cheese and that are of public health importance - requiring a One Health approach - *B. abortus* is in a prominent position. It is therefore essential to carry out epidemiological studies to assess the presence and main risk factors associated with *B. abortus* in AQ. **Material and Methods:** From October 2017 to April 2018, a randomized survey was carried out with the aim of evaluating: i) the frequency of *Brucella* DNA in artisanal cheeses made from raw milk (QALC) from four traditional regions in the state of Minas Gerais, which produce artisanal Minas cheese (QMA), and the Parnaíba region, in the state of Piauí, which produces artisanal rennet cheese; ii) the factors associated with the contamination of QALC by *Brucella* spp. iii) the relationship between spatial clusters of CLA contaminated by the bacterial agent, taking into account the characteristics of the cheeses, such as ripening time and the results of microbiological analyses for other bacterial or viral agents; iv) the possible relationship between clusters of positivity for *Brucella* in CLA and human exposure to the same agent. DNA from fractionated QALC samples was extracted using the traditional phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. PCR was carried out using specific oligonucleotides for the *eryD* gene. Possible associations of *Brucella* positive QALC were analyzed using univariate analyses and spatial analyses, both for ARFPQ with positive QALC and for human exposures to this pathogen and livestock concentrations. **Conclusion:** This study shows that the contamination of QALC by *Brucella* spp. may represent a possible risk to the consumer of these products, highlighting the need for good agricultural and manufacturing practices, as well as quality control systems for QALC. As a random survey, we established baseline data on the frequency of *Brucella* spp. in two types of

ready-to-eat Brazilian QALC. This information is the first to be considered in a system for monitoring temporal and spatial trends and for setting control targets, as well as for future studies on local risk analysis.

Keywords: *Brucella* spp.; brucellosis; artisanal Minas cheese; artisanal Coalho cheese; ripening; nested PCR.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, é permitida a comercialização de queijos artesanais (QA) feitos de leite cru bovino. Em Minas Gerais (MG), os modos de fazer QA foram considerados patrimônio histórico imaterial da humanidade pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), com duas regiões conquistando selos de indicações geográficas (IG): Canastra e Serro.

Contudo, existem outras regiões do estado que também produzem QA, como Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Serra do Salitre, Serro, Serras da Ibitipoca e Triângulo Mineiro. Apesar dos esforços dos órgãos fiscais, ainda se observam muitos desafios, especialmente no que diz respeito à produção de forma segura para a saúde do consumidor deste produto.

Neste sentido, é importante destacar alguns pontos que permanecem em discussão, como os patógenos zoonóticos mais prevalentes nos QA, os fatores de risco para a sua presença neste alimento e a distribuição espacial dos “rebanhos produtores de QA”, tendo em vista que esses produtos geralmente são feitos em “queijarias” na própria fazenda. Dentre os patógenos que podem ser veiculados pelo QA e que se encaixam no contexto da Saúde Única e de importância para a saúde pública, *Brucella* apresenta uma posição de destaque.

Com base no Diagnóstico Situacional do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2022), o Estado de Minas Gerais apresentou, no último estudo epidemiológico, prevalência para brucelose entre rebanhos e entre vacas de 3,6% e 0,8%, respectivamente. Além disso, considerando que o Estado de Minas Gerais possui 216.000 rebanhos e 3.122.000 bovinos leiteiros, e as prevalências encontradas para brucelose, existe uma estimativa de 7.794 rebanhos e 24.976 bovinos com brucelose. Os dados epidemiológicos sobre a brucelose em rebanhos bovinos no Estado de Minas Gerais podem estar refletindo a presença de *Brucella* em QA, conforme observado por Silva et al. (2022).

Em estudo recente, 55 amostras de QA oriundas de diferentes rebanhos da Região do Serro, MG, foram analisadas para a identificação de *Brucella* spp. pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de espécies específicas e isolamento em meio de cultivo. Do total de 55 amostras, 17 (30,9%) foram identificadas como positivas para DNA de *Brucella* pela PCR, e em 1 (1,8%)

amostra de queijo foi identificado no meio de cultivo a presença de *B. abortus*. Os resultados encontrados por Silva et al. (2022) mostraram que o QA da região do Serro pode ser uma fonte de *B. abortus* para seres humanos, o que deve encorajar a cooperação entre órgãos públicos de fiscalização da área de agricultura e de saúde, com enfoque em Saúde Única, com o objetivo de mitigar o risco de transmissão para os consumidores. Portanto, a detecção de amostras positivas para DNA de *Brucella* e o isolamento da bactéria evidenciam que não estão sendo cumpridas, por parte dos produtores de queijos artesanais, as exigências estabelecidas na Lei do Selo Arte nº 13.860/2019, regulamentada pelo Decreto nº 11.099/2022. A referida lei estabelece que a elaboração de queijos artesanais a partir de leite cru deve ser restrita a queijarias situadas em estabelecimentos rurais, sendo necessário o certificado de que o local está livre de tuberculose e brucelose, de acordo com as normas do PNCEBT, ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal, no prazo de até 3 (três) anos a partir da publicação desta legislação.

Desta maneira, é fundamental a realização de estudos epidemiológicos para avaliar a presença e os principais fatores de risco associados à *Brucella* em QA de diferentes regiões do país.

Com base no que foi exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar a prevalência e os fatores de risco para a presença de *Brucella* spp. em QA de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e de uma região do Piauí, além de avaliar a distribuição espacial dessa positividade e possíveis aglomerados entre as regiões e agroindústrias produtoras analisadas. Além de representarem um avanço no conhecimento da situação sanitária desses “rebanhos produtores de QA”, essas informações podem auxiliar os órgãos de defesa sanitária e de fiscalização e inspeção de produtos de origem animal na tomada de decisão em relação à elaboração de procedimentos que visem mitigar o risco de transmissão de brucelose para seres humanos via consumo de QA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO, LOCAL DO ESTUDO E PLANEJAMENTO AMOSTRAL

Este é um estudo para avaliar a frequência e os fatores associados à *Brucella* em 100 amostras de QALC produzidas em quatro regiões de Minas Gerais (MG) – n

= 81 – e na região de Parnaíba, Piauí (PI) – $n = 19$, ambos estados do Brasil, coletadas de outubro de 2017 a abril de 2018. As 100 amostras foram obtidas de 100 agroindústrias rurais de base familiar produtoras de queijos (ARFPQs), com o critério de inclusão sendo a fabricação de QALC feitos com leite de uma única fazenda.

As regiões do estado de Minas Gerais – Serro, Canastra, Triângulo Mineiro e Cerrado – receberam, neste estudo, os códigos de identificação R1, R2, R3 e R4, conforme a ordem de registro no órgão fiscalizador oficial de cada estado. Ressalta-se que as ARFPQs da região de Parnaíba, estado do Piauí, sob o código de registro R5, ainda não possuíam registro e foram consideradas como tempo zero de registro.

A partir de uma lista de 235 ARFPQs em cinco regiões produtoras tradicionais do Brasil – Canastra, Serro, Cerrado, Triângulo Mineiro e Parnaíba – a amostra da população-alvo para estimar a frequência de QALC positivos para *Brucella* spp. foi determinada por sorteio aleatório de 100 (42,5%) amostras. A amostra foi escolhida utilizando a função Randbetween (Microsoft Excel). Foi coletado um queijo inteiro de cada ARFPQ para representá-la, pois cada uma produz queijo utilizando leite proveniente exclusivamente de uma única fazenda. Assim, o tamanho da amostra foi baseado em uma população finita de 235, com margem de erro de 7,5%, nível de confiança de 95% e proporção esperada de 50% de QALC positivos para *Brucella* spp.

2.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Os produtores de queijo foram entrevistados por meio de um questionário estruturado, organizado por grupo de conteúdo, com foco em características socioeconômicas, saúde animal, Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF). As amostras de queijo foram coletadas em suas embalagens e mantidas em caixas isotérmicas sob refrigeração ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) com gelo reciclável durante o transporte até o laboratório para análise.

Dois conjuntos de dados de QALC foram obtidos para avaliar possíveis associações com queijos positivos para *Brucella*. Primeiramente, apenas para QMAs, análises bacterianas exigidas por legislações específicas e teores de umidade (%). Para todas as regiões, foram buscadas possíveis associações da detecção de *Brucella* com duas outras variáveis: período de maturação (abaixo e acima da mediana de 10 dias) e detecção de *C. burnetii*.

Além disso, para todas as regiões do estudo, utilizamos dados de notificação de casos humanos de brucelose realizados no Brasil no mesmo período deste estudo (DATASUS), que incluíram análises de aglomerados espaciais das exposições humanas, para explorar possíveis sobreposições espaciais desses aglomerados com aqueles de queijos positivos para *Brucella*.

Em segundo lugar, para todos os tipos de queijos e regiões do estudo, também utilizamos dados obtidos de um estudo prévio de nossa equipe sobre a presença de vírus nas mesmas amostras, para avaliar possíveis associações com queijos artesanais feitos com leite cru (QALC) positivos para *Brucella* (Silva et al., 2021).

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE QUEIJOS

As amostras de queijo foram divididas em porções menores, de 100 g, e acondicionadas em sacos estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB, São Luís, Brasil), lacrados, identificados e homogeneizados.

O método de extração de DNA foi realizado a partir de 0,5 g de cada queijo pelo método tradicional fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, conforme protocolo de Darwish et al. (2009), com algumas modificações. Especificamente, no início do protocolo, houve algumas mudanças nos volumes: 900 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 e 0,5% SDS) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Silva et al., 2015). Para a precipitação do DNA, foram adicionados 3 volumes de etanol absoluto gelado, e o material genético foi eluído em 100 µL de H₂O mQ (Millipore, Brasil). Depois, realizamos a quantificação do DNA no aparelho Nanodrop.

2.3 NESTED-PCR

O DNA extraído das amostras de QMA foi submetido à nested PCR, cuja região alvo é um fragmento do gene *eryD*, que é exclusivo para amostras de campo de *Brucella*. Os oligonucleotídeos iniciadores Bru.eryD.469.F (5'-CTTCAACCATTTTGGCCATC-3') e Bru.eryD.469.R (5'-CTTGTCCATCAGGCTTTGCT-3') foram utilizados para amplificar uma sequência alvo de 469 pb na primeira PCR, e os iniciadores Bru.eryD.363.F (5'-GCCGCTATTATGTGGACTGG-3') e Bru.eryD.363.R (5'-

GATCGTAGTCGTCGGGTTTA-3') na segunda PCR foram usados para amplificar uma sequência alvo de 363 pb.

2.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

A técnica visa amplificar uma região que não possui polimorfismos suficientes para qualquer análise diferente da confirmação do gênero *Brucella* de campo. Esta nested-PCR não detecta amostras vacinais B19. O sequenciamento Sanger do DNA amplificado por PCR foi realizado no equipamento Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies). As sequências obtidas foram alinhadas e editadas com o software BioEdit 7.2.0 e comparadas com aquelas disponíveis no GenBank. Para isso, usamos a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (BLAST), que localiza regiões de semelhança entre as sequências biológicas (Altschul et al., 1990).

Finalmente, efetuamos o cadastro da sequência de nucleotídeos de uma das amostras positivas para *Brucella* no banco de dados do GenBank.

2.5 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS E ESPACIAIS

A frequência de QALC positivos para *Brucella* spp. foi determinada com um intervalo de confiança (IC) de 95% e usada como teste de triagem para ARFPQs positivas para *Brucella* spp. Fatores associados aos QALC positivos para *Brucella* spp. foram avaliados pelo teste exato de Fisher. O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a hipótese nula de homogeneidade entre dois testes, PCR e cultivo, realizados em amostras pareadas. Fatores associados ao QMA positivos para *Brucella* foram avaliados usando o teste de Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Para os queijos das cinco regiões estudadas, foram avaliadas possíveis associações das proporções de QALC positivos para *Brucella* spp. com o tempo de registro no órgão oficial de fiscalização, utilizando o qui-quadrado para tendência linear. Além disso, foram avaliadas possíveis tendências lineares de sua positividade com taxas de maturação acima da mediana de 10 dias (<https://epitools.ausvet.com.au/trend>).

As microrregiões, unidades da federação, limites municipais e população estimada foram obtidas no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE

(<https://www.ibge.gov.br>). As análises espaciais realizadas foram: Mapas coropléticos da distribuição espacial para visualização da localização do número de amostras positivas nos municípios; estimativa de densidade de Kernel (EDK) para identificar a localização de aglomerados de ocorrências de amostras positivas e de casos humanos; Mapas de varredura espacial (Scan) para identificar aglomerados espaciais com significância estatística.

Para a construção dos mapas coropléticos, foi utilizado o software ArcGIS versão 10.4 (<https://www.arcgis.com>), com as classes 'Sem casos' (cor branca), 'Baixo' (verde), 'Médio' (amarelo), 'Alto' (laranja) e 'Muito Alto' (vermelho) para distribuição espacial dos casos, utilizando o quartil.

A EDK foi realizada para identificar aglomerados de ARFPQ com QALC positivos para *Brucella* spp. (função quadrática, cálculo de densidade e raio adaptativo), com a construção de um mapa de varredura espacial (Scan) para identificar aglomerados espaciais com significância estatística (espaço de varredura de análise pura), usando o modelo de Bernoulli.

Apenas para QMA, as análises EDK foram realizadas em amostras com outros resultados bacterianos positivos (Estafilococos coagulase-positivos e Estafilococos coagulase-negativos), para avaliar possíveis correlações entre os aglomerados. O processamento, interpretação, visualização e análise dos dados foram realizados usando ArcGIS (<https://www.arcgis.com/>), SatScan (<https://www.satscan.org/>) e TerraView (<https://www.dpi.inpe.br/terralib5/wiki/doku.php>).

Foram realizadas as análises espaciais da variável casos humanos de brucelose para buscar possíveis associações espaciais com os aglomerados de queijos positivos para *Brucella*.

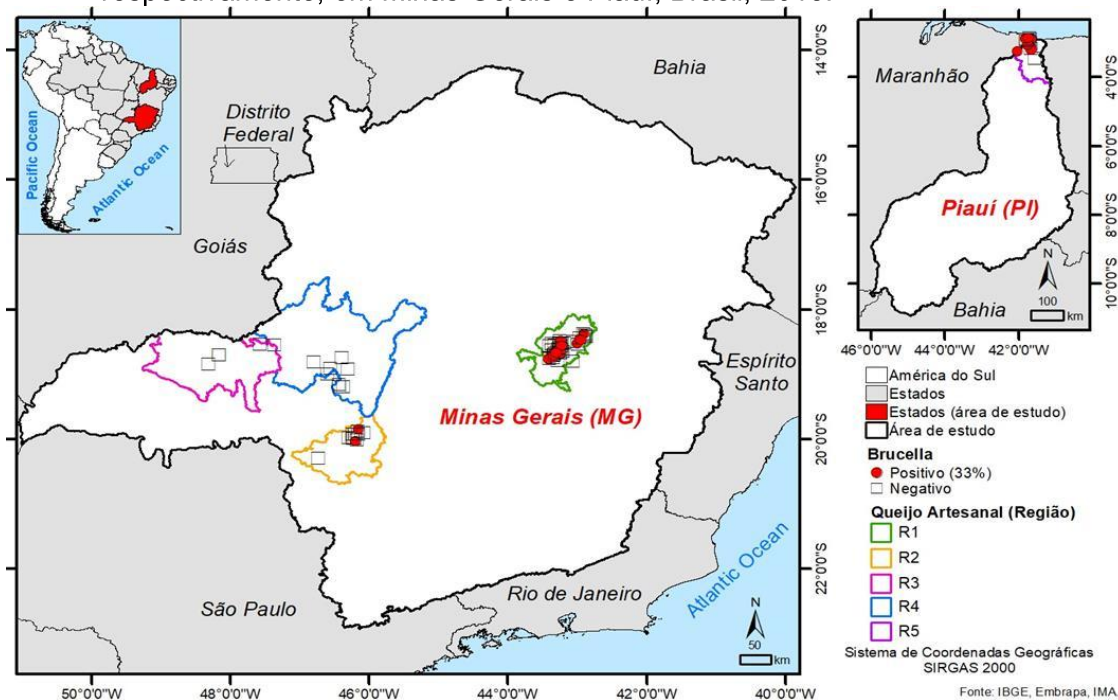
Todos os casos de brucelose humana notificados no Brasil, de 1998 a 2022, foram levantados (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>).

3 RESULTADOS

O fragmento parcial do gene *eryD* de *Brucella* spp. foi detectado em 33 amostras de QALC (33,0%; IC 95% 13,3%-68,4%) do total de 100 amostras. Confirmamos tratar-se de *Brucella* via sequenciamento (número de acesso: PQ373862). A Figura 1 mostra a distribuição espacial das agroindústrias rurais

familiares processadoras de queijos artesanais feitos de leite cru de Minas Gerais e do Piauí, que apresentaram resultados positivos e negativos para *Brucella*.

Figura 1 - Distribuição espacial das agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo artesanal de leite cru positivos - ARFPQ (círculos vermelhos) e negativos (quadrados brancos) para *Brucella* nas regiões Serro, Canastra, Triângulo Mineiro, Cerrado e Parnaíba, respectivamente, em Minas Gerais e Piauí, Brasil, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal (2024).

A Tabela 1 mostra a distribuição de frequência dos queijos artesanais feitos de leite cru de acordo com possíveis variáveis explicativas. As regiões de produção, as taxas de precipitação e o período de maturação foram associados às taxas de queijos positivos para *Brucella* ($p < 0,05$). A região de produção 5 apresentou o maior percentual de positividade, seguida pelas regiões 1 e 2. Não houve amostras positivas nas regiões 3 e 4.

Em relação à estação do ano, os queijos produzidos na estação chuvosa foram associados às maiores taxas de positividade. Por fim, queijos com maturação até a mediana de 10 dias apresentaram maiores taxas de positividade.

Tabela 1 - Análise univariada para positividade de *Brucella* em queijos artesanais feitos de leite cru, Brasil, 2018.

Variáveis	Total	Positivos (%)	P - valores ^a
Production site			
R1	53	18 (34.00)	0.0005
R2	15	2 (13.30)	
R3	5	0 (00.00)	
R4	8	0 (00.00)	
R5	19	13 (68.40)	
Coliformes totais (CFU) ^b			0.29
10 to 4000	58	12 (20.70)	0.20
5900 to 2500000	23	8 (34.8)	
Coliformes fecais (CFU) ^b			
10 to 500	64	14 (21.90)	0.75
730 to 170000	17	6 (35.30)	
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva (CFU) ^b			0.47
10 to 10 ³	49	11 (22.40)	
>10 ³	32	9 (28.1)	
Coagulase Negative <i>Staphylococci</i> (CFU) ^b			0.95
0 to 10 ³	14	4 (28.60)	
>10 ³	67	16 (23.90)	
Adenovírus humano			
Não	83	28 (33.70)	0.95
Sim	17	5 (29.40)	

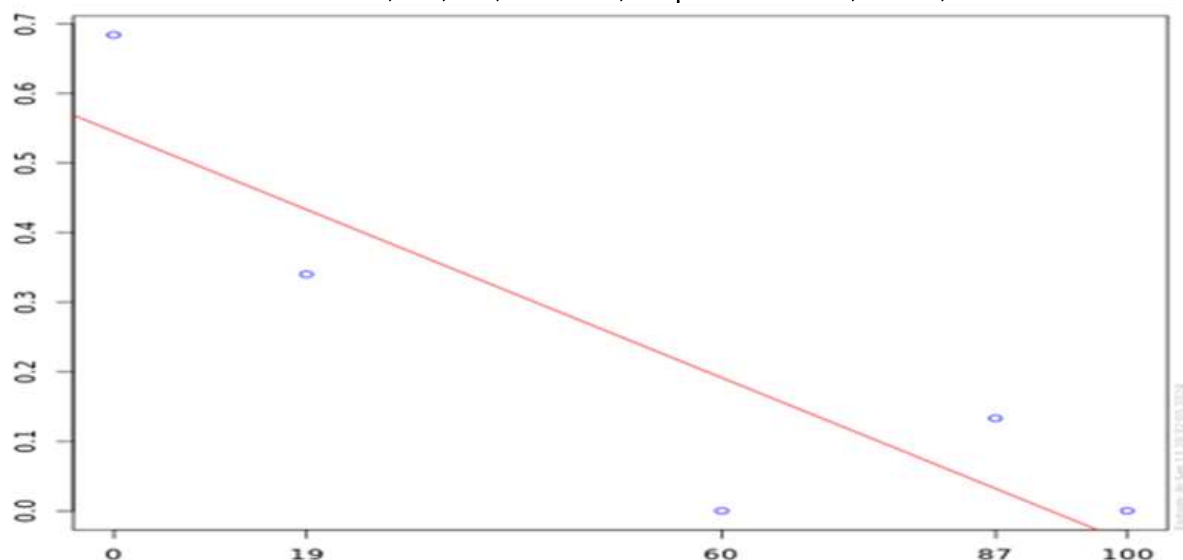
Human norovírus			0.19
Não	72	27 (37.5)	
Sim	28	6 (21.40)	
<i>Coxiella burnetii</i>			0.17
Não	75	28 (37.30)	
Sim	25	5 (20.00)	
Época de chuvas ^b			0.001
Não	36	19 (52.80)	
Sim	64	14 (21.90)	
Período de maturação (dias) ^b			0.04
4 to 10	47	16 (34.0)	
12 to 46	34	4 (11.8)	
Grau de umidade (%) ^{b,c}			0.35
20.39 to 45.89	44	9 (20.50)	
46.12 to 56.33	34	11 (32.40)	
pH ^{b,c}			0.43
4.00 to 4.88	39	12 (30.80)	
4.89 to 5.36	39	8 (20.50)	

^a Testes exatos de Fisher; ^b análises não realizadas nos queijos coalho, Piauí; ^c análise não realizadas em todas as amostras de QMA.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).

Como fortalecimento dessa relação entre o período de maturação e a positividade, a ordenação das regiões produtoras por porcentagem de queijos com maturação acima da mediana de 10 dias mostrou uma tendência linear decrescente em relação às porcentagens de queijos positivos para *Brucella* (inclinação = -0,0053, $p = 0,0001$) (Figura 2).

Figura 2 - Tendência linear inversa entre as taxas de queijos artesanais de leite cru positivos para *Brucella* e os escores de maturação acima da mediana de 10 dias (inclinação = -0,0053, $p = 0,0001$). Os escores 0, 19, 60, 87 e 100 correspondem às porcentagens de queijos com tempo de maturação acima da mediana em R5, R1, R3, R2 e R4, respectivamente, Brasil, 2018.



Porcentagens de queijos com maturação acima da mediana (10 dias).

Fonte: Arquivo pessoal (2024).

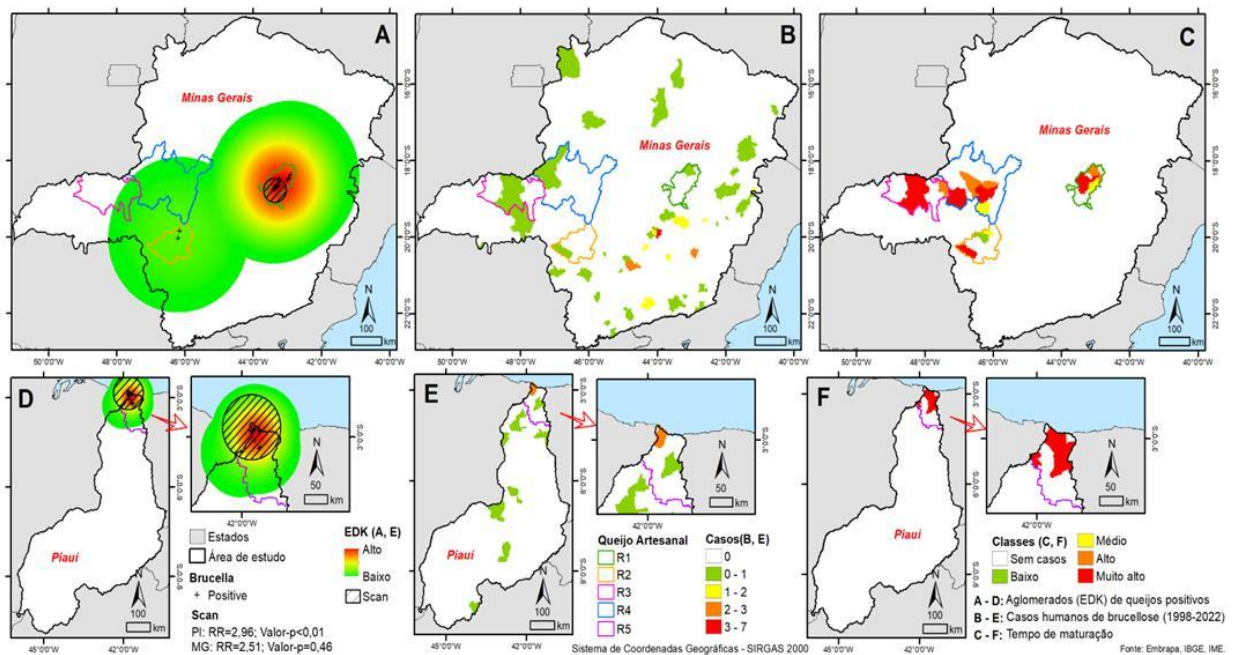
A Figura 3 mostra a ocorrência de dois clusters de alta densidade por EDK para queijo artesanal de leite cru (RMAC) positivos para *Brucella* em agroindústrias de uma região produtora de queijo Minas artesanal, localizada em Minas Gerais (A), e em uma região produtora de queijo artesanal de Coalho, no estado do Piauí (D), sendo que o cluster desta última região foi significativo por Scan ($p < 0,01$).

Os mapas coropléticos mostram que houve sobreposição de um município com relatos de casos humanos de brucelose na faixa de 2 a 3 casos notificados no período de 1998 a 2022 na região produtora R5, que apresentou aglomerados de agroindústrias com queijos positivos para *Brucella*, confirmados por EDK e Scan, respectivamente (E). Por outro lado, tais mapas também mostraram sobreposição de municípios com relatos de pelo menos um caso humano de brucelose no período de 1998 a 2022 em cada uma das regiões produtoras de Minas Gerais, incluindo a que apresentou um aglomerado de alta densidade de agroindústrias com queijos positivos, R1 (B).

Verificou-se também a sobreposição de aglomerados de queijos com menores taxas de maturação, tanto com os de queijos positivos para *Brucella*, confirmados

especialmente apenas por EDK (C), quanto com os positivos confirmados espacialmente por ambos, EDK e Scan (F).

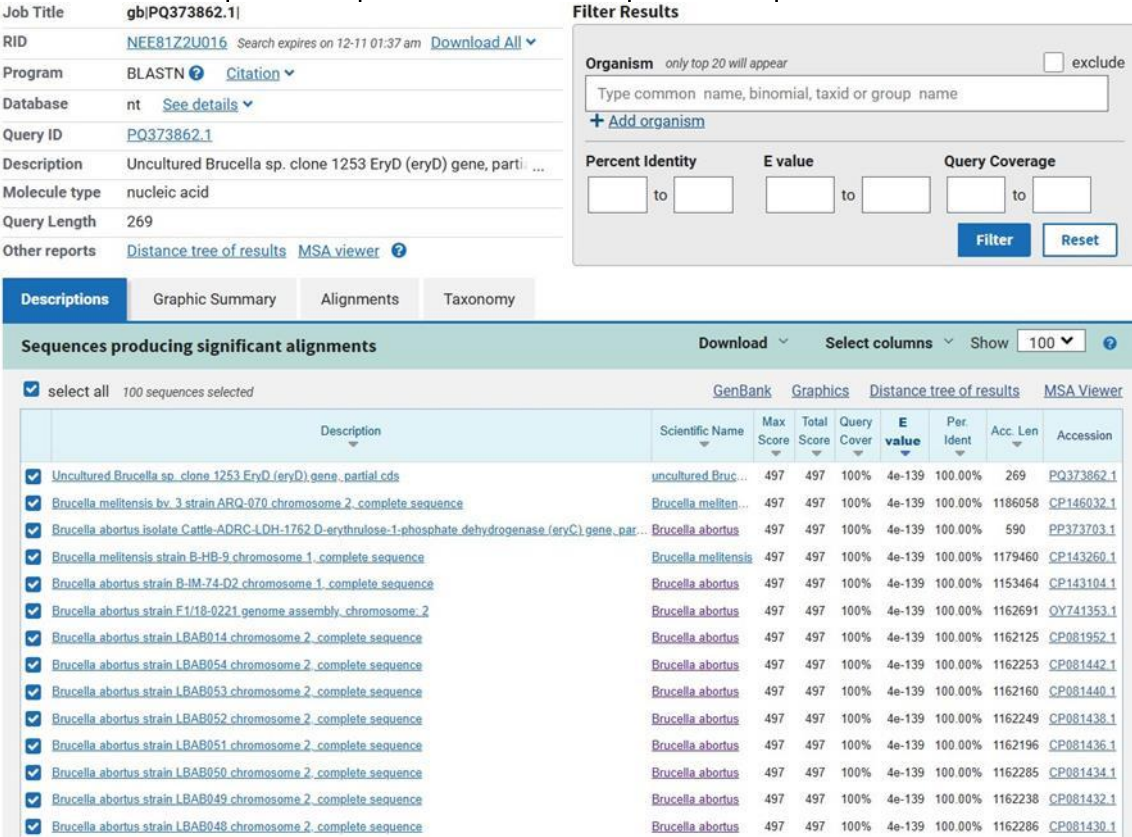
Figura 3 - Análise de estimativa de densidade de kernel e densidade de clusters de *Brucella* em agroindústrias familiares rurais de processamento de queijo (RFCPA) de Minas Gerais e Piauí, Brasil, e mapas coropléticos das distribuições de algumas variáveis relacionadas. (A) Aplicação de KDE e Scan para queijo artesanal de leite cru (RMAC) positivo para *Brucella* em RFCPAs de quatro regiões produtoras de queijo artesanal de Minas Gerais e uma região produtora de queijo artesanal de Coelho, no estado do Piauí (D). Mapas coropléticos das distribuições de casos humanos de brucelose em Minas Gerais (B) e Piauí (E), acumulados no período de 1998 a 2022. Mapas coropléticos das distribuições de RMAC com períodos de maturação de até 10 dias em Minas Gerais (C) e Piauí (F).



Fonte: Arquivo pessoal (2024).

O sequenciamento do amplicon (número de acesso: PQ373862) resultou em 100% de identidade com outras amostras depositadas de ortólogos de *Brucella* de campo.

Figura 4 - Resultado do BLASTn mostrando alguns dos alinhamentos entre a nossa sequência depositada e outras sequências depositadas de *Brucella*.



Fonte: National Library of Medicine (2024).

Neste resultado, é possível observar uma alta similaridade entre as sequências pelo valor de "E", ou seja, quanto menor for o valor de "E", maior a chance de a similaridade entre as sequências ser verdadeira. Além disso, os 100 primeiros resultados gerados pelo BLAST correspondem a sequências de *Brucella*.

Figura 5 - Resultado do BLASTn, no qual a sequência depositada de *Brucella* alinhou com 100% de identidade e sem lacunas com outra sequência depositada de *Brucella*.

***Brucella melitensis* bv. 3 strain ARQ-070 chromosome 2, complete sequence**

Sequence ID: [CP146032.1](#) Length: 1186058 Number of Matches: 1

Range 1: 928809 to 929077 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
497 bits(269)	4e-139	269/269(100%)	0/269(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATCCTGAAGCTTCATGCATTGGCAATCGTCTCGCCAAATTCGCGCCGATGCTCATCGG	60		
Sbjct 929077	ATCCTGAAGCTTCATGCATTGGCAATCGTCTCGCCAAATTCGCGCCGATGCTCATCGG	929018		
Query 61	CTCCCAGAACACATAGTCGAGGCCGCGACCTGCCGCATGTTGCGCCACCTCGGCCAGCA	120		
Sbjct 929017	CTCCCAGAACACATAGTCGAGGCCGCGACCTGCCGCATGTTGCGCCACCTCGGCCAGCA	928958		
Query 121	GTCGATGGCGATCTTGATAAGTTCTTCGCGGCGCGCCGGATCATCGAAATCCTTATAGGT	180		
Sbjct 928957	GTCGATGGCGATCTTGATAAGTTCTTCGCGGCGCGCCGGATCATCGAAATCCTTATAGGT	928898		
Query 181	GAAGATTGCAAACTGCGTACCGACGGACTTGCCGCCAAGATCGCCGATAATATCGGCAAA	240		
Sbjct 928897	GAAGATTGCAAACTGCGTACCGACGGACTTGCCGCCAAGATCGCCGATAATATCGGCAAA	928838		
Query 241	GGTCTTGAACCAAGTCCACATAATAGCGGC	269		
Sbjct 928837	GGTCTTGAACCAAGTCCACATAATAGCGGC	928809		

Fonte: National Library of Medicine (2024).

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram detectados um terço dos QALC avaliados com DNA de *Brucella* por Nested PCR e confirmação por sequenciamento. A frequência de amostras com DNA de *Brucella* spp. mostrou heterogeneidade entre as regiões estudadas, apresentando positividade para a maioria das regiões objeto do estudo; contudo, duas regiões não apresentaram positividade.

Outros perigos foram analisados em estudos prévios nestes queijos, e os resultados mostraram que parte das amostras de QALC de todas as cinco regiões tradicionais produtoras analisadas apresentaram DNA de *C. burnetii*. Além de *C. burnetii*, amostras de QMA também foram analisadas simultaneamente para outros patógenos e contaminantes, apresentando 28%, 20%, 40% e mais de 80% com identificação de altas contagens de coliformes totais, coliformes fecais, ECP e ECN, respectivamente, fato que comprova falhas nos padrões microbiológicos estabelecidos (Silva et al., 2021).

Além disso, 18% e 28% dos QALC analisados neste estudo também foram positivos para o adenovírus humano (Silva et al., 2021), que é um indicador de contaminação fecal humana em alimentos, e para o norovírus humano (Silva et al.,

2021), um dos patógenos virais mais envolvidos em surtos de origem alimentar humana no mundo. Alguns trabalhos prévios detectaram *Brucella* spp. em QALC no Brasil (Miyashiro et al., 2007; Langer et al., 2012; Kobayashi et al., 2017).

Entretanto, a frequência de amostras positivas para *Brucella* spp. que encontramos neste estudo foi semelhante à de outro que encontrou 30,9% em queijos do Serro (Silva et al., 2022), e superior a dois outros estudos que encontraram as seguintes proporções: i) 3,33% em queijos vendidos em mercado ou praça pública e 13,33% nos comercializados em mercadinho, de Parnaíba, Piauí (Bezerra et al., 2019), e 19,27% em queijos Minas frescal e queijos curados que haviam sido vendidos sem fiscalização sanitária em São Paulo (Miyashiro et al., 2007). Cumpre ressaltar que este último trabalho citado encontrou uma taxa de 81,08% de amostras vacinais B19 e 18,92% de cepas de campo de *Brucella*. Entretanto, o presente trabalho somente pesquisou amostras de campo de *Brucella*. Em outro estudo, em que foi utilizada a técnica de PCR, foi identificado 21,21% (14/66) das amostras positivas para *Brucella* spp. (Silva et al., 2016).

Outro estudo revelou informações importantes sobre a viabilidade de *B. abortus* em condições ambientais, especificamente durante o processo de maturação de alimentos. De acordo com o trabalho, *B. abortus*, um patógeno responsável pela brucelose, foi capaz de sobreviver por mais de 17 dias a 24°C, uma temperatura que pode ser encontrada em ambientes não refrigerados, como em alguns processos de maturação de queijos e outros produtos lácteos (Santiago-Rodriguez et al., 2015).

De acordo com nossos resultados, a relevante taxa de positividade de *Brucella* encontrada em algumas regiões de Minas Gerais e uma região do Piauí corroboram com o relatório situacional do PNCEBT, onde o documento destaca que, no período de 2014 a 2018, o estado de Minas Gerais acompanhou uma tendência de diminuição de exames, com aumento subsequente de casos de brucelose (MAPA, 2020).

Desta forma, em Minas Gerais, de acordo com o relatório situacional do PNCEBT, as prevalências de animais e de focos de brucelose no ano de 2002 foram 1,09% e 6,04%, respectivamente. No ano de 2011, as prevalências de animais e de focos de brucelose foram 0,81% e 3,59%, respectivamente. Nota-se uma queda na prevalência (MAPA, 2020). Contudo, o estado de Minas Gerais possui um território muito vasto e, por isso, existem prevalências distintas entre as regiões dentro do estado, o que pode influenciar nessa positividade. Com relação ao estado do Piauí, o relatório situacional do PNCEBT não apresentou um estudo de prevalência de

brucelose, ou seja, a situação é completamente negligenciada e desconhecida; contudo, nosso estudo encontrou uma tendência de positividade (60%) para a região R5 (MAPA, 2021).

A brucelose é uma doença endêmica no país, e a situação epidemiológica é diferente entre os estados e entre regiões do mesmo estado. Essa variação na prevalência entre regiões pode ter influenciado esse percentual de positividade nos queijos no estado de Minas Gerais e mesmo entre os estados comparados (MAPA, 2020).

Este trabalho utilizou a análise de aglomerados a fim de obtermos uma visão espacial das microrregiões com maior densidade de casos positivos e, desta maneira, podermos utilizar essa ferramenta para direcionar a vigilância epidemiológica.

Ao analisar a distribuição espacial de ARFPQ com queijos artesanais positivos para *Brucella*, verificou-se aglomerado e alta concentração em R1. Atualmente, essa microrregião é a que possui maior número de estabelecimentos registrados no IMA e, por isso, maior representatividade em volume de produção. Desta forma, o patógeno pode estar entrando na cadeia de produção de queijo através do rebanho leiteiro ou por meio da contaminação ambiental. A detecção nos permite afirmar que o patógeno está presente nos rebanhos bovinos das respectivas regiões.

É sabido que a legislação federal estabelece que, para a elaboração do queijo Minas artesanal, deve ser observado um período de maturação de 60 dias para posterior comercialização, sendo que este prazo visa diminuir o risco microbiológico e de transmissão para os consumidores. Entretanto, o tempo de maturação extenso pode comprometer as características particulares deste tipo de produto (Martins et al., 2018).

Em razão disso, foi elaborada a norma federal que estabelece que os queijos artesanais feitos a partir de leite cru sejam maturados em período inferior ao prazo de 60 dias e que sejam realizados estudos técnicos-científicos que certifiquem que a redução desse período de maturação não oferece risco para a qualidade e a inocuidade do produto (BRASIL, 2011). Posteriormente, no estado de Minas Gerais, foi estabelecido, através da Portaria nº 2051, de 07 de abril de 2021 do IMA, que algumas microrregiões possuem um período mínimo para maturação de seus produtos, abrindo exceção à regra geral estabelecida em legislação federal.

Contudo, a flexibilização do período de maturação precisa ser vista com cuidado, visto que estudos nacionais revelaram sobrevivência de *Brucella* ao longo da maturação por um longo tempo.

Um estudo brasileiro mostrou que, para reduzir 90% nas contagens de *B. abortus* inoculados experimentalmente em queijos tipo parmesão, foram necessários $5,9 \pm 0,7$ dias em queijos maturados a 18°C, valor chamado internacionalmente de D18°C, indicando que, com 95% de confiança, o valor de D18°C estaria entre 4,6 e 7,1 dias para *Brucella* (Starikoff et al., 2016).

E, ainda, outro estudo avaliou o efeito da maturação na sobrevivência de *B. abortus* em queijos tipo Minas artesanal e obteve como resultados que, nos queijos elaborados com inóculo de 103 UFC/mL, *B. abortus* sobreviveu por até 15 dias de maturação, e nos queijos elaborados com 106 UFC/mL de *B. abortus*, por período entre 22 e 29 dias. Sendo assim, o período de maturação entre 15 e 29 dias foi suficiente para garantir a ausência de *B. abortus* 2308 inoculada nas concentrações de 103 UFC/mL e 106 UFC/mL de leite, respectivamente, para a elaboração de queijos tipo Minas artesanal, reforçando a importância da maturação para a segurança deste alimento (Mussi et al., 2018).

Os resultados do presente estudo reafirmam a relação do período de maturação com a positividade das amostras, uma vez que a ordenação das regiões produtoras por porcentagem de queijos com maturações acima da mediana de 10 dias mostrou uma tendência linear inversa com as porcentagens de queijos positivos para *Brucella* (Inclinação = -0,0053, $p = 0,0001$).

O tempo de maturação do queijo artesanal feito a partir de leite cru, do ponto de vista biológico, à medida que vai passando o tempo de maturação, vai diminuindo a atividade de água (a_w) do queijo e, com isso, diminui a viabilidade do gênero *Brucella*.

De modo geral, durante a maturação ocorrem alterações microbiológicas no queijo, com predomínio de microrganismos iniciadores ou “starter” no início da maturação e, com o decorrer do processo, vai diminuindo a atividade de água (a_w), com aumento do teor de NaCl e da atividade hidrolítica das próprias enzimas microbianas, permitindo o controle da atividade metabólica e multiplicação dos microrganismos iniciadores, para posteriormente ocorrer o crescimento da microbiota secundária (Mussi et al., 2018).

De acordo com os resultados do presente estudo, as amostras que não foram coletadas no período chuvoso tiveram uma tendência de maior taxa de positividade de *Brucella*, o que pode estar relacionado a uma menor proporção de bactérias ácido-láticas (BAL) nessas amostras de leite cru. Com essa suposta menor taxa de BAL, consequentemente a redução da competição microbiana no leite pode dar margem ao crescimento e persistência de outros organismos não benéficos, inclusive patógenos como *Brucella*.

Esta evidência é fortalecida pelos achados a seguir. Trabalho para avaliar o leite cru utilizado em queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes durante a estação chuvosa encontrou alta concentração de bactérias ácido-láticas (BAL), variando de 5×10^4 UFC/mL a 4×10^6 UFC/mL (Valente et al., 2022). Entretanto, amostras de leite cru coletadas no período seco apresentaram níveis indetectáveis de BAL no leite da mesorregião da Serra do Salitre. Isto indica que, no período seco, pode haver um potencial perigo microbiológico, posto que, com uma população diminuída de BAL, pode reduzir a competição microbiana no leite, permitindo que outros microrganismos, inclusive patogênicos, por exemplo, *Brucella* spp., se mantenham viáveis no meio (Valente et al., 2022).

Outro estudo ressalta que as bactérias ácido-láticas (BAL), além de sua capacidade de fermentar o leite e outros alimentos, desempenham um papel importante na garantia da inocuidade dos produtos alimentares. Isso ocorre principalmente devido à sua atividade inibitória sobre uma variedade de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Lunardi et al., 2021).

Em outro trabalho, foi realizado ensaio de atividade antagonista dos sobrenadantes de cultura de bactérias ácido-láticas. Neste, foi encontrado que, das 18 amostras analisadas, 13 (BAL) (72,22%) apresentaram crescimento rápido e maior concentração em caldo, reduzindo o pH do meio abaixo de 4,65, e foram capazes de inibir todas as amostras de *B. abortus* testadas. Enquanto, quando o pH estava entre 4,65 e 5, as (BAL) conseguiram inibir parcialmente o crescimento de *B. abortus*, e no pH acima de 5,6 não foi observada inibição. Nesse sentido, o estudo confirma que o pH baixo (ácido) é um fator fundamental para a ação antimicrobiana das (BAL), e isso ajuda a proteger o leite cru e seus derivados contra a proliferação de patógenos como *Brucella*. Isso reforça a importância da presença de (BAL) no leite para garantir a segurança microbiológica (Mussi, 2018).

O presente estudo mostra que a cadeia produtiva do QALC é vulnerável a contaminações por *Brucella*. Estudos mostram que os ruminantes são os principais reservatórios de *B. abortus*, eliminando a bactéria por meio de produtos de nascimento e/ou aborto, leite, urina e fezes. Em bovinos, a principal forma de excreção é pela via horizontal ou vertical. No útero de animais gestantes, são encontradas maiores concentrações de *Brucella*. Fetos abortados, membranas placentárias e secreções uterinas são as principais fontes de contaminação ambiental por *Brucella*. As vacas infectadas podem eliminar os microrganismos no leite e transmitir a infecção ao recém-nascido, podendo também entrar na cadeia de produção de QALC (Khurana et al., 2021).

A comercialização dos queijos Minas e Coalho artesanais, além do aspecto cultural, está diretamente relacionada ao desenvolvimento socioeconômico dos territórios tradicionais de produção. Com a regulamentação do Selo Arte e do Selo Queijo Artesanal, por meio do Decreto Federal 11.099/2022, os QALC ganharam notável reconhecimento nacional, sendo apreciados em diversos estados deste país. No entanto, os resultados deste estudo e de outros anteriores desta equipe mostram que a qualidade microbiológica precisa ser melhorada para tornar os queijos mais seguros para os consumidores.

Este estudo tem alguns aspectos que o fortalecem e que devem ser destacados. Para atingir nossos objetivos, os órgãos oficiais brasileiros de inspeção de alimentos e saúde animal (IMA e MAPA) e os setores de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) devem estabelecer parcerias de colaboração transdisciplinares e intersetoriais com os de pesquisa em saúde pública (FIOCRUZ), os de vigilância em saúde (FUNED e Instituto Evandro Chagas) e os de educação (UFJF). Com essa estratégia, será possível agregar a melhor infraestrutura laboratorial com experiência de pesquisa em *Brucella* spp. no Brasil, com setores de vigilância em saúde humana e animal, de forma a reduzir as lacunas existentes e pesquisar esse patógeno na perspectiva de uma só saúde e apoiar políticas públicas relacionadas de forma mais abrangente.

5 CONCLUSÃO

O estudo identificou uma alta frequência de QALC contaminados por *Brucella* no presente estudo. Por se tratar de um produto elaborado a partir de leite cru, maiores

são os desafios sanitários na aquisição de matérias-primas e no preparo de um produto que seja inócuo aos consumidores.

Com base nos resultados que indicam baixa segurança dos QALC para *Brucella*, mas considerando a relevância socioeconômica desses produtos em alguns estados do Brasil, concluímos que é fundamental desenvolver e implementar ações educativas voltadas à conscientização sobre o preparo e consumo de produtos artesanais feitos com leite cru. Essas ações devem ser apoiadas por estratégias integradas de vigilância, controle e prevenção, envolvendo a saúde humana, animal e ambiental, adotando uma abordagem de saúde única.

REFERÊNCIAS

ANDRETTA, M. A. T. T.; FERREIRA, L. R.; CARVALHO A. F.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A. Status de segurança microbiana do queijo artesanal Serro produzido no Brasil. **Journal Dairy Science**, v. 102, n. 12), p. 10790-10798, 2019.

AUSUBEL, F. M. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 2003.

BEZERRA, S. S.; KIM, P. C. P.; SANTOS, F. J. S.; CASTRO, K. N. C.; LIRA, N. S. C.; MENDES, E. S. Detection of *Brucella* spp. in arti-san cheese commercialized in Parnaíba, Piauí, Brazil. **Medicina Veterinária**, v. 13, p. 33-37, 2019.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA, 2006.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Relatório Situacional do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA, 2020.

BRASIL. **Resolução nº 7 de 28 de novembro de 2000**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011**. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

BRASÍLIA. Decreto nº 11.099, 21 de junho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 22 jun. 2022.

BRASÍLIA. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 15 jun. 2018.

BRASÍLIA. Lei nº 13.860, de 14 de junho de 2018. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 27 set. 2019.

CARVALHO, L. S. *et al.* Detecção de biovares de *Brucella* em rebanhos bovinos e sua identificação molecular por PCR. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 10, p. 2312-2318, 2011.

CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Brucelose: revisão sobre as tendências recentes de patogenicidade e diagnóstico laboratorial. **Journal Laboratory Physicians**, USA, v. 2, n. 2, p. 55-60, 2010.

COSTA, R. G. B. *et al.* Artisanal Minas cheeses – a brief review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022.

DARWISH, S. F.; ALLAM, H. A.; AMIN, A. S. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, p. 461-467, 2009.

DUCH, A. A. S. **Estimativa da prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal na microrregião do serro - Minas Gerais. 2015.** Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de leite e derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2015.

GONÇALVES, V. S. P. *et al.* Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 35-45, 2009.

GONZALEZ, J. R. *et al.* Aplicação de PCR em tempo real para a detecção de *Brucella* em bovinos no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2275-2284, 2014.

IZADI, A.; MOSLEMI, E.; TABATABAEI PANAH, A.; KHEIRI MANJILI, H. Detecção de *Brucella* spp em produtos lácteos utilizando técnicas de nested e hemi nested PCR. **Annals of Biological Research**, v. 5, p. 124-131, 2014.

KHURANA, S. K. *et al.* Brucelose bovina - uma revisão abrangente. **Veterinary Quarterly**, v. 41, p. 61-88, 2021.

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F. D.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S. Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

LAGE, A. *et al.* Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 202 - 212, 2008.

LANGER, A. J.; AYERS, T.; GRAMA, J.; LYNCH, M.; ANGULO, F. J.; MAHON, B. E. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws-United States, 1993-2006. **Emerging Infected Diseases**, v. 18, n. 3, p. 385-391, 2012.

LUNARDI, A. *et al.* Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 26383-26409, 2021.

MARTINS, M. G. G. **Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência**. Especialização em Microbiologia, Repositório UFMG, 2018.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A. Brucelose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2020. p. 21-55.

MEURER, I. R. *et al.* Seroprevalence estimate and risk factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 3, p. 261-269, 2021.

MIYASHIRO, S. *et al.* Detection of *Brucella* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 17-22, 2007.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 2051, de 07 de abril de 2021.** Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2021.

MINAS GERAIS. **RESOLUÇÃO SES/MG Nº 6.362, DE 08 DE AGOSTO DE 2018.** Estabelece procedimentos para o licenciamento sanitário do microempreendedor individual, do empreendimento familiar rural e do empreendimento econômico solidário, que exercem atividades de baixo risco sanitário na área de Alimentos, 2018.

MUSSI, J. M. S. **Efeito Do Antagonismo In Vitro de Bactérias Ácido-Láticas e da Maturação Na Sobrevivência de *Brucella Abortus* em Queijos Tipo Minas Artesanal.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2018.

NETTO, M. M. **A geografia do queijo minas artesanal.** Tese - (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – FAO. **O estado da alimentação e da agricultura. Serviço de Gestão de Publicações da FAO.** Roma, p. 176, 2009.

PAULA, C. L.; DE MIONI, M. S. R.; APPOLINÁRIO, C.M.; KATAYAMA, E. R.; ALLENDORF S. D.; MEGID, J. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 82, p. 1-5, 2015.

ROCHA, K. P. C.; CERQUEIRA, R. B.; ANDREA, M. V.; BRANDÃO, P. V. D.; VIEIRA, V. P.; SILVA JÚNIOR, L. S.; SILVA, B. P. Utilização De Um Teste Elisa Indireto para o Diagnostico da Brucelose em Amostras de Soro de Búfalas. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 29, 2017.

ROZENTAL, T. *et al.* Primeira detecção molecular de *Coxiella burnetii* em queijo artesanal brasileiro: um risco negligenciado à segurança alimentar em produtos lácteos crus prontos para consumo. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 208-212, 2020.

SANTIAGO-RODRÍGUEZ, M. R. *et al.* Survival of *Brucella abortus* aqp X mutant in fresh and ripened cheeses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 2, 2015.

SILVA, J. *et al.* *Brucella abortus* detected in cheese from the Amazon region: differentiation of a vaccine strain (B19) from the field strain in the states of Pará, Amapá and Rondônia, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 705-710, 2016.

SILVA, M. R. *et al.* Occurrence of *Brucella* in Minas artisanal cheese of Serro micro-region: an important public health problem. **Revista Médica de Minas Gerais**, 2018.

SILVA, M. R. *et al.* Assessment of Viral Contamination of Five Brazilian Artisanal Cheese Produced from Raw Milk: a Randomized Survey. **Food and Environmental Virology**, v. 13, p. 528-534, 2021.

SILVA, R. C. C.; ALVES, M. C. S. O uso de ferramentas de bioinformática para análise de dados genéticos: uma revisão. **Scientific Electronic Archives**, v. 17, n. 1, 2023.

SOBRAL, D. *et al.* Queijos artesanais de Minas, nem todos são QMA: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, p. 55-67, 2022.

SOLA, M. C.; FREITAS, F.; SENA, E.; MESQUITA, A. J. Brucelose Bovina: revisão. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

STARIKOFF, K. R. *et al.* Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 3743, 2016.

VALENTE, G. L. C. **Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, swabs de superfícies e queijo Minas artesanal da região de Campo da Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva.** Tese (Doutorado), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2022.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Revisão da detecção de *Brucella* spp. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 306-13, 2010.