



**ENZO FURTADO SILVA**

**DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM QUEIJO MINAS  
ARTESANAL (QMA) DA MICRORREGIÃO DE ARAXÁ**

**LAVRAS - MG**

**2023**

**ENZO FURTADO SILVA**

**DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM QUEIJO MINAS  
ARTESANAL (QMA) DA MICRORREGIÃO DE ARAXÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras na forma de  
artigo científico como parte das exigências do  
curso de Ciências Biológicas, para o título de  
Licenciado.

Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientadora

Me. Maysa Serpa Gonçalves

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2023**

**ENZO FURTADO SILVA**

**DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM QUEIJO MINAS ARTESANAL (QMA) DA  
MICRORREGIÃO DE ARAXÁ  
DETECTION OF *Brucella* spp. IN ARTISANAL MINAS CHEESE (AMC) FROM THE  
MICRORREGION OF ARAXÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras na forma de  
artigo científico como parte das exigências do  
curso de Ciências Biológicas, para o título de  
Licenciado.

Aprovado em 24 de Julho de 2023.  
Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dornelles UFLA  
Me. Maysa Serpa Gonçalves UFLA  
Med. Vet Marcilene Daniel Damasceno UFLA

Prof. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientadora

Me. Maysa Serpa Gonçalves

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente ao meu avôhai (avô e pai) Sebastião (in memoriam), o maior incentivador das realizações dos meus sonhos. Obrigado por ter me criado, por ter me ensinado a amar, por ter me ensinado o caminho certo, por me mostrar que eu poderia voar. Ressalto minha gratidão por confiar em mim todos esses anos de formação acadêmica, me dando força para prosseguir, insistir e nunca desistir dos meus sonhos. Dedico a ele esse trabalho, estou aqui para dar continuidade ao que começou, mais que seu filho, eu sou seu fã. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.

Agradeço a minha tia, Crysthine, que sempre esteve ao meu lado, por todo amor, carinho, afeto, dedicação e amparo. Sua presença foi essencial durante esses anos de graduação e é fundamental na minha vida. Obrigado por confiar no meu futuro. Aqui estão os resultados dos seus esforços.

A minha mãe e minha irmã, Ana Gina e Lorena, pelo amor e carinho.

A minha namorada Alice, pelo amor, pelo carinho, por tornar minha vida mais colorida e mais prazerosa de ser vivida. Mesmo em momentos difíceis, ter ela ao meu lado faz tudo ficar mais leve e mais divertido. Te admiro, sua grande força me inspira e me dá forças para seguir em frente. Sua coragem, determinação e perseverança me incentivam a melhorar a correr atrás dos meus objetivos. Só tenho a agradecer pelo apoio incondicional oferecido em todos os aspectos e pela sua presença em minha vida meu amor.

Honro o fechamento deste ciclo agradecendo a minha monografia aos amigos de curso e grandes companheiros de jornada. Em especial aos brilhantes camaradas: Caio, João Paulo, André, João Augusto, José Lucas e Mynor. Obrigado, pelo excepcional apoio e incentivo que me deram durante esses anos, que sempre estiveram ao meu lado compartilhando sua experiência de forma construtiva.

Aos meus professores do curso de Ciências Biológicas por me ensinarem a ser um profissional ético e comprometido com a verdade.

A minha orientadora Dra. Elaine Maria Seles Dorneles pela oportunidade, crucial para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha coorientadora Me. Maysa Serpa Gonçalves pela dedicação, disponibilidade, entusiasmo científico e ensinamentos.

Agradeço a todos os alunos, técnicos, professores e funcionários dos Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva, por todo apoio técnico e profissional imprescindível no desenvolvimento deste trabalho

A Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela qualidade de ensino, por ter me mostrado um universo de possibilidades e experiências.

## RESUMO

O propósito deste estudo foi utilizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar a presença do DNA da bactéria *Brucella* spp. nos Queijos Minas Artesanal. O estudo foi realizado na microrregião de Araxá e foram coletadas 82 amostras diretamente com produtores de 11 propriedades: 9 de leite, 10 de pingo e 63 de queijo. O DNA foi extraído utilizando o kit Qiagen DNeasy PowerFood Microbial. Para amplificação do DNA, foram empregados os primers B4 e B5. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 110 V, e acrescido 0,4µL de brometo de etídeo. As análises da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) revelaram que a presença de DNA de *Brucella* spp. nas amostras de Queijo Minas Artesanal (QMA) foi de 1,22% (1/82), sendo a amostra positiva proveniente do queijo coletado no dia de maturação 0.

**Palavras-chave:** Leite cru. Queijo. Segurança alimentar. DNA. PCR.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to utilize the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to identify the presence of *Brucella* spp. DNA in Minas Artisanal Cheese. The study was conducted in the Araxá microregion, and a total of 82 samples were collected directly from producers from 11 properties: 9 from milk, 10 from whey, and 63 from cheese. DNA extraction was performed using the Qiagen DNeasy PowerFood Microbial kit. The DNA amplification utilized the B4 and B5 primers. Subsequently, the PCR products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis at 110 V, and 0.4µL of ethidium bromide was added. The PCR analysis revealed that the presence of *Brucella* spp. DNA in the Minas Artesanal Cheese (QMA) samples was 1.22% (1/82), with the positive sample collected on day 0 of maturation.

**keywords:** Raw milk. Food safety. Cheese. DNA. PCR.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>17</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>18</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de queijos minas artesanais (QMA) é uma atividade tradicional em diversas regiões, sendo parte importante da cultura alimentar. No entanto, a utilização de leite não pasteurizado nesse tipo de produção pode favorecer a contaminação por patógenos, como a *Brucella*, que pode ser introduzida no ambiente durante a ordenha e processamento do leite, ou por contato com animais infectados.

A *Brucella* é uma bactéria patogênica responsável por causar a brucelose, uma doença de importância tanto na saúde humana quanto animal. A infecção pode ser transmitida através do consumo de alimentos contaminados, sendo que os queijos minas artesanais podem ser apontados como um dos produtos lácteos associados à presença dessa bactéria.

A brucelose é uma doença de notificação obrigatória em muitos países, o que evidencia sua relevância para a saúde pública. Diante disso, torna-se crucial o desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos para a detecção da presença do DNA de *Brucella* no QMA, de forma a possibilitar a adoção de medidas preventivas e corretivas pelos produtores e autoridades sanitárias.

Nesse contexto, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se destacado como uma ferramenta eficaz na detecção de material genético de diversos patógenos. A PCR permite amplificar regiões específicas do DNA, tornando possível a identificação precisa de microrganismos mesmo em baixas concentrações, viabilizando a aplicação dessa técnica para a detecção de *Brucella* em queijos minas artesanais.

Embora existam métodos tradicionais de cultivo e isolamento da bactéria, a PCR oferece vantagens significativas, como a rapidez na obtenção de resultados e a capacidade de detecção mesmo em amostras complexas. A aplicação da PCR na detecção de *Brucella* em QMA é fundamental para fornecer informações precisas sobre a segurança desses produtos, além de contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas e corretivas na cadeia de produção.

Este trabalho se propõe a utilizar da PCR como ferramenta diagnóstica. Através da utilização de uma abordagem molecular, visando a garantia da qualidade e segurança desses produtos. Assim, a pesquisa busca não apenas atender às necessidades do setor alimentício, mas também colaborar com a proteção da saúde dos consumidores e a preservação das tradições gastronômicas regionais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é uma preciosidade gastronômica brasileira com raízes tradicionais seculares. Sua produção artesanal envolve a utilização de leite cru enriquecido com um soro fermentado endógeno conhecido como "pingo" (DAS DORES; FERREIRA, 2012).

O QMA é um produto típico e sua receita foi trazida pelos portugueses durante a colonização do Brasil. Desde então, passou por diversas adaptações e aprimoramentos. A produção do QMA de Araxá é feita de forma artesanal, com leite de vaca fresco e cru, e apresenta características distintas que o tornam único e apreciado, como sabor marcante, aroma característico, textura especial e maturação. Em 2008 o QMA foi agraciado com o reconhecimento do Instituto do Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN) como um valioso Patrimônio Cultural Imaterial do Brasil. A produção de queijos artesanais em Araxá é uma tradição que remonta ao século XVIII e a região é uma das produtoras de queijo Minas artesanal, que tem sua identidade própria de acordo com o local onde é fabricado (ARAÚJO et al., 2004).

Como é um produzido com leite não pasteurizado, alguns estudos têm sido realizados para avaliar a adoção de boas práticas de fabricação e realizar a caracterização físico-química do QMA, visando garantir sua qualidade e segurança (OLIVEIRA et al., 2017; PINTO et al., 2009). No entanto, a falta de regulamentação e fiscalização adequadas ainda é um desafio para a produção e comercialização do produto, o que pode levar à produção de queijos de qualidade inferior e à falta de segurança alimentar, ou seja, à possível transmissão de microrganismos patogênicos para os seres humanos por meio da ingestão do produto (DAS DORES; FERREIRA, 2012).

Assim, um dos processos preconizados para a segurança alimentar do QMA é um tempo mínimo de maturação. A maturação envolve transformações microbiológicas e físico-químicas que afetam o sabor, aroma e textura do queijo. Durante a maturação, ocorre a quebra de proteínas em aminoácidos, a conversão de lactose em ácido lático, o desenvolvimento de bactérias e fungos que contribuem para o sabor e aroma do queijo e a perda de umidade, o que ajuda a contribuir para a eliminação de bactérias patogênicas (SALES et al., 2015). Segundo Assis Sales (2015), a maturação do QMA pode ser

influenciada por fatores sazonais, como a temperatura e umidade do ar, que podem afetar a composição microbiológica do queijo e, conseqüentemente, suas características sensoriais.

Segundo a legislação vigente, o período de maturação exigido para o QMA varia de acordo com a microrregião de produção. Conforme a Portaria IMA nº 2051/2021, o Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro deve passar por um período de maturação mínimo de 17 dias (SILVA et al., 2022). Contudo, apesar de ser um processo fundamental para garantir a segurança e a qualidade do queijo (DE ASSIS SALES et al., 2015), apenas a maturação não é capaz de eliminar todas as bactérias patogênicas. Assim, a higiene e boas práticas de produção também são fundamentais para garantir a segurança alimentar do produto (MARTINS et al., 2018).

Entre os microrganismos que podem ser veiculados por meio do QMA está a bactéria *Brucella* spp. Esse patógeno pode permanecer vivo em leite e produtos lácteos não processados (VERRAES et al., 2015), portanto, é fundamental garantir que o leite utilizado na produção do queijo seja de qualidade e seguro para os consumidores.

Conforme De Oliveira (2016), *Brucella* spp. é uma bactéria Gram-negativa, apresentando uma característica distintiva de pequenos cocobacilos não encapsulados, além de serem parasitas intracelulares facultativos. As células da *Brucella* são encontradas isoladas, em pares ou em cadeias curtas. A bactéria pode prosperar em condições com um pH entre 5,8 e 8,7 e tem seu pico de crescimento em condições com um pH entre 6,6 e 7,4, a 37 °C.

A *Brucella* spp. é capaz de infectar células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas, utilizando mecanismos de adesão, invasão e sobrevivência intracelular. A bactéria é capaz de evitar a resposta imune do hospedeiro, interferindo na ativação de células T e na produção de citocinas pró-inflamatórias, além de ser capaz de modular a resposta imune do hospedeiro para favorecer sua sobrevivência intracelular (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). A *Brucella* também é capaz de modular a expressão de genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro, como o sistema regulatório de dois componentes e o *quorum sensing* (DE FIGUEIREDO et al., 2015).

A bactéria é capaz de infectar humanos e animais domésticos, causando a brucelose, uma doença infecciosa que pode ser transmitida por animais infectados ou consumo de alimentos contaminados, como leite e derivados não pasteurizados, carne mal passada ou crua (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Os agentes etiológicos da brucelose humana são *B. abortus* (de gados), *B. melitensis* (de ovelhas e cabras) e *B. suis* (de porcos), enquanto *B. canis* (de cães) causa infecções esporádicas (MAURELIO et al., 2016). A doença é caracterizada por um quadro febril acompanhado por inúmeros sintomas, como mialgia, artralgia, sudorese, fadiga, dor de cabeça e dor abdominal (MAURELIO et al., 2016). A disseminação da *Brucella* pode acontecer por meio do contato direto ou indireto com animais infectados ou pela ingestão de alimentos contaminados. A brucelose é uma doença ocupacional que afeta principalmente trabalhadores envolvidos no manejo de animais e na cadeia de produção de laticínios, carnes e seus produtos derivados (DE PAULA ANTUNES; MEGID, 2013).

Uma das técnicas utilizadas para a detecção da bactéria é a PCR (reação em cadeia da polimerase), que é uma técnica sensível e específica capaz de detectar baixas concentrações de DNA bacteriano em amostras de alimentos, permitindo a identificação rápida e precisa de *Brucella* em produtos de origem animal (PAULA et al., 2015).

Os casos de brucelose transmitida por alimentos são frequentes em nível global (RON-ROMAN., et al 2012). No Brasil, foi identificada uma conexão significativa ( $p < 0,05$ ) entre o consumo de leite cru ou derivados e indivíduos que testaram positivo para brucelose (RAMOS., et al 2008). Nos seres humanos é uma doença preocupante que pode alcançar quadros mais graves, tem potencial debilitante, que pode levar a cronicidade, capaz de se tornar uma infecção generalizada (MEGID., et al 2010). É imprescindível que as entidades governamentais considerem um potencial de maior risco para os consumidores de queijos feitos com leite cru. A única maneira de garantir a segurança do leite cru e seus subprodutos é a erradicação de patógenos.

O controle da bactéria em produtos de origem animal é fundamental para reduzir o risco de transmissão da doença aos consumidores (KANG et al., 2006). Portanto, é necessário que medidas de controle e prevenção sejam implementadas na cadeia de produção de alimentos, incluindo a detecção precoce de *Brucella abortus* (PAPPAS et al., 2006). O uso da PCR para detecção de *Brucella abortus* em alimentos pode contribuir significativamente para a prevenção de surtos de brucelose em humanos (DEAN et al. 2012).

Dessa forma, apesar de sua importância cultural e gastronômica, o QMA enfrenta desafios e ameaças em relação à sua produção e comercialização, inclusive na questão sanitária e de segurança alimentar. Portanto, a preservação e valorização do QMA envolve a busca por soluções que conciliam as exigências de qualidade e segurança alimentar com a

manutenção das características tradicionais, assegurando assim a continuidade dessa tradição gastronômica no país. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Brucella* spp. através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em QMA, bem como na matéria-prima utilizada para produzir o queijo: o leite e o pingo.

### 3 METODOLOGIA

Foram utilizadas amostras de leite, pingo e queijo de bovinos provenientes de 11 produtores cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) como produtores de QMA da microrregião de Araxá. As amostras coletadas foram: leite (n=9), pingo (n=10) e queijo (n=63), totalizando 82 amostras. Foram coletados queijos com 0, 7, 14, 28, 42 e 63 dias após a fabricação de todos os produtores amostrados.

As amostras de leite, pingo e queijo foram identificadas e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e processadas nos Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva (LISASC), da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária (FZMV), da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Um volume inicial de 50 mL de "pingo" foi centrifugado em baixa velocidade a 130 x g por 5 minutos para decantar o sal. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 2500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 1,8 mL de água tamponada com peptona e transferido para um tubo de coleta fornecido pelo kit de extração de DNA DNeasy® PowerFood® Microbial (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os próximos passos da extração de DNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante para este mesmo kit de extração.

As amostras de leite foram descongeladas em temperatura de geladeira (2 a  $8^{\circ}\text{C}$ ). Os tubos foram centrifugados a 2500 x g por 15 min para separar as 3 fases do leite (fase de células, fase aquosa e fase de gordura), a fase aquosa foi removida, as outras duas fases foram homogeneizadas. 5g do conteúdo homogeneizado e 45 mL de água peptonada foram colocados em outro falcon. 1,8 mL do conteúdo foi transferido para os tubos coletores fornecidos.

Os queijos foram totalmente ralados para homogeneização e depois congelados. Doze horas antes de serem processadas, foram retiradas as amostras do freezer e colocadas na geladeira para descongelamento lento de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ . Cinco gramas (5g) de fragmentos foram misturados com 45 mL de água peptonada e homogeneizados em Stomacher por 5 minutos

com 400 golpes por minuto. Após homogeneização 1,8 mL foram transferidos para tubos de coleta fornecidos pelo kit DNeasy PowerFood Microbial (Qiagen, Hilden, Germany) para a extração do DNA. Tudo foi feito de acordo com as informações do fabricante.

Um espectrofotômetro (Nanodrop®) foi usado para quantificar as amostras.

A detecção de DNA de *Brucella* spp. através da PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Baily et al. (1992) B4, 5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' e B5, 3'-CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG-5'. Os oligonucleotídeos iniciadores codificam um fragmento de 223 pb do gene bcp31 que codifica uma proteína de antígeno de 31 kDa de *Brucella abortus*. Esse gene é altamente conservado em todas as espécies de *Brucella* e é frequentemente usado como alvo para a detecção de *Brucella* spp. em diferentes tipos de amostras, incluindo alimentos e tecidos.

A PCR foi realizada em um volume total de 25L. Cada reação com a concentração de 10 X de Buffer IB (Phoneutria), dNTP's 2mM, iniciador B4 e B5 com 10µM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Taq polimerase 5U/µL e 50ng/µL de DNA. Concentração final de 1X de Buffer IB, dNTP's 200 µM, iniciador B4 com 1µM, iniciador B5 com 1µM, Mgcl<sub>2</sub> 1,5mM, Taq polimerase com 1,25U e DNA a 4ng/µL. Como controle positivo utilizou-se DNA de uma cepa conhecida de *Brucella* spp. As amplificações foram conduzidas seguindo o seguinte protocolo: uma etapa inicial de hotstart a 94°C por 3 minutos, seguida de desnaturação a 94°C por 30 segundos, então foram realizados 30 ciclos de anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e, por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi submetido à análise através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,4 µL de brometo de etídeo, e visualizado em um transiluminador ultravioleta.

#### 4 RESULTADOS

Das 82 amostras testadas por PCR, 1 amostra de queijo no dia 0 de maturação (1,22%) foi encontrada positiva para *Brucella* spp., enquanto 81 foram negativas.

Figura 1 – Fotografia de um gel de agarose mostrando os resultados de uma PCR.



Legenda: Utilizando primers para *Brucella* spp., com bandas de 223 pb, a eletroforese em gel de agarose a 1,5% revelou a amplificação do produto da reação em cadeia da polimerase.

Fonte: Do autor (2023).

## 5 DISCUSSÃO

O método de PCR para a identificação de *Brucella* spp. foi realizado seguindo o protocolo descrito por Baily et al. (1992) e mostrou 1 amostra de QMA positiva para *Brucella* spp. na região de Araxá, em Minas Gerais. A PCR clássica não fornece informações sobre a viabilidade do agente no alimento, sendo necessário, para esta confirmação, a realização do isolamento do agente ou outras técnicas de PCR que quantificariam apenas o DNA de agentes microbiológicos viáveis. Apesar de o teste de PCR utilizado não ter confirmado a viabilidade de *Brucella* spp. em 1 queijo, ele indica a existência desse problema. Conforme o Decreto Estadual nº 42.645 de 5 de junho de 2002, a presença de *Brucella* não é permitida.

Oito variedades conseguiriam sobreviver em queijos por mais de 29 dias (NEVOT et al., 1962). De forma experimental, foi usado leite contaminado para avaliar a resistência de *Brucella abortus*. Os autores relatam que conforme a maturação, de acordo com a queda do ph, as contagens do agente foram reduzindo paulatinamente de forma que no décimo oitavo dia nenhuma *Brucella* pode ser recuperada. A sobrevivência pode variar em diferentes linhagens de *Brucella*, isso pode ser associado à resistência da bactéria (PLOMMET et al., 1988).

O tempo de sobrevivência da *Brucella* no queijos pode ser afetado, afinal de contas eles são elaborados com diversas formas de processamento: utilizando leite cru ou não,

maturação em diferentes temperaturas, pH e atividade da água variados, a interação com microflora bacteriana ou contaminantes microbianos, tudo isso pode afetar o tempo de sobrevivência da *Brucella*. Diferentes linhagens de *Brucella* também podem sobreviver a diferentes tempos de maturação, mesmo diante das mesmas condições nos queijos (SANTIAGO-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Uma prática que aumenta consideravelmente os riscos para a saúde pública é a comercialização e consumo em curtos períodos de maturação uma vez que o pouco tempo de maturação não é eficaz para alcançar o pH entre 4,0 e 3,5, indispensável para a inutilização da *Brucella* (CORBEL et al., 2006). Ainda que a legislação estabeleça um período de maturação de 17 dias para o Queijo Minas Artesanal de Araxá, as pessoas na própria propriedade podem estar consumindo queijo antes da maturação, podem consumir o leite cru e os animais podem estar transmitindo a bactéria aumentando a transmissão no rebanho.

No Estado de Minas Gerais a legislação em vigor não aborda explicitamente a detecção de *Brucella* no QMA. A realização anual do exame de brucelose no rebanho e a vacinação de bezerras é o controle utilizado para a presença de *Brucella* no QMA atribuído ao mercado interno. As indústrias agrícolas que têm autorização para comercializar o queijo de Minas artesanal em outros estados não estão sempre livres da possibilidade de presença de *Brucella* spp. (SOARES FILHO et al., 2012). É imprescindível promover medidas adicionais que reforcem a segurança dos produtos derivados de leite cru. Isso pode ser alcançado ao estabelecer um período de maturação mais extenso e ao aprimorar a vigilância constante sobre a qualidade e segurança do leite cru empregado na produção dos queijos artesanais.

O aprimoramento da supervisão da segurança do leite cru pode ser alcançado por meio do uso de diagnósticos que identifiquem o DNA específico da *Brucella*. A realização de testes ágeis para descobrir anticorpos no leite cru, para monitorar os rebanhos das agroindústrias, pode garantir ainda mais a verificação da realização dos testes de brucelose pelos veterinários privados e a autenticidade dos *status* "livres de brucelose" (MIYASHIRO et al., 2007).

Os casos de brucelose transmitida por alimentos são frequentes em nível global (RON-ROMAN et al., 2012). No Brasil, foi identificada uma conexão significativa ( $p < 0,05$ ) entre o consumo de leite cru ou derivados e indivíduos que testaram positivo para brucelose (RAMOS et al., 2008). Nos seres humanos é uma doença preocupante que pode alcançar quadros mais graves, tem potencial debilitante, que pode levar a cronicidade, capaz de tornar

uma infecção generalizada (MEGID; MATHIAS; ROBLES, 2010). É imprescindível que as entidades governamentais considerem um potencial de maior risco para os consumidores de queijos feitos com leite cru. A única maneira de garantir a segurança do leite cru e seus subprodutos é a erradicação de patógenos.

O risco potencial à saúde pública representado pelo Queijo Minas Artesanal contaminado com *Brucella* spp. não pode ser ignorado. A brucelose bovina é uma doença endêmica em basicamente todos os estados do Brasil, incluindo Minas Gerais, os responsáveis pela produção de QMA precisam cumprir normas para eliminar essa doença, seguidas de vigilância sanitária e epidemiológica, como maneira de assegurar a segurança para o consumidor. Além disso, é necessário que essas indústrias agropecuárias sejam monitoradas com mais frequência por fiscais em relação ao controle sanitário e à certificação do gado.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica de PCR mostrou-se uma importante ferramenta laboratorial na vigilância epidemiológica da contaminação de queijos por *Brucella* spp. podendo ser uma alternativa a ser utilizada para a fiscalização de alimentos. Apesar de apenas uma amostra ter indicado positividade, a presença dela já indica potencial risco à saúde humana e à segurança alimentar.

## REFERÊNCIAS

ADETUNJI, Shakirat A. et al. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of osteoarticular brucellosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0007112, 2019.

ARAÚJO, João Paulo Andrade et al. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1845-1860, 2020.

ARAÚJO, Romilda Aparecida Bastos Monteiro. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2004.

BAILY, G. G. et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.

BEZERRA, Suely Santos et al. Detecção da *Brucella* spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru. 2014.

CANAL, Cláudio Wageck et al. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Ciência Rural**, v. 33, p. 377-379, 2003.

CARVALHO, Robert Ferreira Barroso de et al. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. e1042014, 2016.

COLMENERO, J. D. et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. **Medicine**, v. 75, n. 4, p. 195-211, 1996.

CORBEL, Michael J. Brucellosis in humans and animals. **World Health Organization**, 2006.

CORTEZ, A. et al. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 1226-1228, 2006.

COSTA, Renata Golin Bueno et al. Os queijos Minas artesanais—uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e16911830012-e16911830012, 2022.

DAS DORES, Milene Therezinha; FERREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, 2012.

DE ASSIS SALES, Gilson. Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano. 2015.

DE FIGUEIREDO, Paul et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella–Host Interactions. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 6, p. 1505-1517, 2015.

DE OLIVEIRA, Fernanda Souza. Avaliação do papel da proteína Cinase associada ao receptor de interleucina-1 4 (IRAK-4) na resposta imune durante a infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella abortus*. 2012.

DE PAULA ANTUNES, João Marcelo Azevedo; MEGID, Jane. *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1301-1312, 2013.

DEAN, Anna S. et al. Clinical manifestations of human brucellosis: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 12, p. e1929, 2012.

LÓPEZ-SANTIAGO, Rubén et al. Immune response to mucosal brucella infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1759, 2019.

MAURELIO, Anna Paula Vitirito et al. Situação epidemiológica mundial da brucelose humana. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 4, p. 597-560, 2016.

MEGID, Jane; MATHIAS, Luis Antonio; ROBLES, Carlos. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **The Open Veterinary Science Journal**, p. 119-126, 2010.

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

OLIVEIRA, Alberto Lima de et al. Caracterização do queijo minas artesanal do cerrado mineiro da região do Alto Paranaíba. 2017.

PAPPAS, Georgios et al. The new global map of human brucellosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 2, p. 91-99, 2006.

PAULA, Carolina Lechinski de et al. Detection of *Brucella* spp. in unpasteurized cow milk by polymerase chain reaction (PCR). 2015.

PAULA, Carolina Lechinski de et al. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-5, 2015.

PESSEGUEIRO, Pedro; BARATA, Conceição; CORREIA, José. Brucelose: uma revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

PINTO, Maximiliano Soares et al. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do Serro,

Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

PLOMMET, M. et al. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. **Le Lait**, v. 68, n. 2, p. 115-120, 1988.

SANTIAGO-RODRÍGUEZ, María del Rosario et al. Survival of *Brucella abortus* aq p X mutant in fresh and ripened cheeses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 2, p. 170-175, 2015.

SOARES FILHO, P. M. et al. Confirmação de infecção por *Brucella abortus* em um rebanho bovino certificado livre em Minas Gerais: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1133-1136, 2012.

SILVA, Marcio Roberto et al. Ocorrência de *Brucella* em queijo Minas artesanal da microrregião do Serro: Um importante problema de saúde pública. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n. supl 5, p. 79-84, 2018.

SILVA, Marcio Roberto et al. Recovery of *Brucella* in raw milk Minas artisanal cheese approved for consumption by official inspection agency in Brazil: assessment of prevalence and risk factors through One Health integrated approaches. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 11, p. 1091-1099, 2022.

RAFAEL, Viviane da Cruz. Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra. 2017.

RAMOS, Taciana Rabelo Ramalho et al. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaina, Tocantins. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 133-138, 2008.

RON-ROMÁN, Jorge et al. Case report: First report of orchitis in man caused by *Brucella abortus* biovar 1 in Ecuador. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 3, p. 524, 2012.

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