

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

Isabela Vieira Barbosa

**Detecção de *Brucella* spp. por nested PCR e fatores associados à sua
ocorrência em queijos artesanais produzidos com leite cru**

Juiz de Fora

2026

Isabela Vieira Barbosa

**Detecção de *Brucella* spp. por nested PCR e fatores associados à sua
ocorrência em queijos artesanais produzidos com leite cru**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Simone Miyashiro

Juiz de Fora

2026

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

Barbosa, Isabela Vieira.

Detecção de *Brucella* spp. por nested PCR e fatores associados à sua ocorrência em queijos artesanais produzidos com leite cru / Isabela Vieira Barbosa. -- 2026.

94 p. : il.

Orientador: Márcio Roberto Silva

Coorientadora: Simone Miyashiro

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, 2026.

1. Queijos artesanais de leite cru. 2. Nested PCR. 3. *Brucella* spp.. 4. Uma Só Saúde. I. Silva, Márcio Roberto , orient. II. Miyashiro, Simone, coorient. III. Título.

Isabela Vieira Barbosa

**Detecção de *Brucella* spp. por nested PCR e fatores associados à sua
ocorrência em queijos artesanais produzidos com leite cru**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 31 de agosto de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Roberto Silva – Orientador
Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Simone Miyashiro – Coorientadora
Instituto Biológico

Prof. Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Igor Rosa Meurer
HU-UFJF/Ebserh

Profa. Dra. Karina Neoob de Carvalho Castro
Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, 17/08/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Roberto Silva, Usuário Externo**, em 29/09/2026, às 10:22, 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 **Karina Neoob de Carvalho Castro, Usuário Externo**, em 29/09/2026, às 11:45, 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 **Igor Rosa Meurer, Usuário Externo**, em 29/09/2026, às 13:28, 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 29/09/2026, às 20:24, 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 **Simone Miyashiro, Usuário Externo**, em 01/10/2026, às 07:43, 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 **3150321** e o código CRC **6AFB730B**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por seu infinito amor e por ser meu sustento, força e misericórdia ao longo desta jornada.

Aos meus pais, **Sheila e Acir**, pelo apoio incondicional desde a decisão de seguir por este caminho, por estarem ao meu lado em todos os momentos e por acreditarem em mim quando eu mesma duvidei.

Aos meus avós, **Shirley, Olga e Édiro**, pelo carinho, cuidado e amor que ultrapassam qualquer distância.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, **Paula e Giovanna**, sem as quais eu não teria chegado até aqui. Agradeço pelo companheirismo, pelas conversas, conselhos e pela dedicação de tempo e esforço nesta pesquisa, sendo verdadeiros pontos de calma e suporte.

Às minhas companheiras de pesquisa, **Samantha, Fabíola e Thyanne**, pela amizade, pelas trocas e por dividirem esta caminhada comigo.

Aos meus amigos em Cristo e irmãos de coração, **Yara, Vanessa e Danilo**, por enxergarem em mim o que eu não via. Obrigada pela amizade inabalável, por acalmarem meu coração ansioso e por me permitirem ser eu mesma em cada etapa.

À **Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)**, por proporcionar experiências ímpares e oportunidades que impulsionaram meu crescimento profissional.

À **Embrapa Gado de Leite** e ao **Laboratório de Microbiologia do Leite**, pelas oportunidades de aperfeiçoamento na área de Biologia Molecular.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, **Cláudia, Otávio, Bruna, Joice e Miriani**, por todos os ensinamentos, conselhos, amizade e pelas inúmeras risadas compartilhadas.

Ao **Prof. Dr. Márcio Roberto Silva**, pela orientação, confiança e auxílio constante. Agradeço por acreditar no meu trabalho e se fazer presente em todas as etapas desta conquista.

À **Profa. Dra. Simone Miyashiro**, pela confiança, ensinamentos, suporte e por aceitar me acompanhar nesta trajetória como coorientadora.

Ao **Prof. Dr. João Batista Ribeiro**, pela primeira oportunidade que fez toda a diferença na minha carreira, além da confiança, dos ensinamentos valiosos e da constante disposição em ajudar.

Ao membro da banca, **Dr. Igor Rosa Meurer**, por aceitar o convite e pelas correções e sugestões essenciais para o aprimoramento deste trabalho.

A todos que estiveram comigo até aqui, a minha mais sincera gratidão!

RESUMO

Embora os queijos artesanais de leite cru (QALC) representem um importante segmento da cadeia produtiva de alimentos no Brasil, seu consumo pode constituir um risco à saúde pública, uma vez que são elaborados a partir de leite não pasteurizado e, portanto, podem veicular agentes zoonóticos. A brucelose, causada por bactérias do gênero *Brucella*, destaca-se nesse contexto, ainda que a investigação desse agente não seja exigida em alimentos no Brasil, de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pelos atos regulatórios. A reação em cadeia da polimerase (PCR) representa uma ferramenta promissora para a detecção de *Brucella* spp. em alimentos, porém sua aplicação depende da obtenção de DNA de qualidade e do controle de interferentes presentes nos produtos lácteos. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de *Brucella* spp. em QALC provenientes de nove regiões produtoras dos estados de Minas Gerais e do Piauí, bem como avaliar fatores epidemiológicos potencialmente associados à ocorrência do agente. Foram avaliadas 222 amostras de QALC, submetidas a diferentes metodologias de extração de DNA, das quais foi selecionado e padronizado um protocolo baseado em tiocianato de guanidina. A detecção de *Brucella* spp. foi realizada por nested PCR direcionada ao gene *eryD*, considerando-se positivas as amostras que apresentaram o fragmento esperado de 363 pb na segunda reação. Os fatores associados foram avaliados por meio de análises estatísticas univariadas e espaciais, considerando o local de produção, as contagens de coliformes totais e fecais e de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), a presença de *Coxiella burnetii*, a época de chuvas, o período de maturação, o grau de umidade e o pH. Fragmentos do gene *eryD* foram detectados em 24 amostras (10,8%; IC 95%: 7,1–15,7%), distribuídas em quatro regiões produtoras (Serro, Araxá, Canastra e Piauí). Em nove amostras, observou-se exclusivamente o fragmento de 469 pb, mesmo após a segunda reação, sendo esses resultados considerados inconclusivos quanto à presença do agente. O local de produção apresentou associação significativa com a ocorrência de *Brucella* spp. ($p < 0,0001$), assim como as contagens de SCP ($p = 0,03$). A análise de *Odds Ratio* (OR) indicou maior chance de positividade nas amostras com contagens elevadas de SCP ($p = 0,04$). A frequência de amostras positivas diminuiu com o aumento do tempo transcorrido desde o reconhecimento oficial das regiões como tradicionais produtoras de queijo pelo órgão estadual de defesa agropecuária ($p < 0,0001$). As análises

espaciais identificaram dois clusters de alta densidade de amostras positivas, um em Minas Gerais e outro no Piauí. Os resultados demonstraram a ocorrência de DNA de *Brucella* spp. em QALC provenientes de diferentes regiões produtoras e reforçam a importância da investigação desse agente em alimentos produzidos com leite cru, contribuindo para a compreensão de aspectos epidemiológicos relacionados à cadeia produtiva, para o fortalecimento de ações de vigilância e controle e para a implementação de ações educativas contínuas junto aos produtores, sob a perspectiva de Uma Só Saúde.

Palavras-chave: *Brucella* spp.; queijos artesanais; leite cru; nested PCR; Uma Só Saúde.

ABSTRACT

Although raw milk artisanal cheeses (RMAC) represent an important segment of the food production chain in Brazil, their consumption may pose a public health risk, as they are made from unpasteurized milk and may therefore harbor zoonotic agents. Brucellosis, caused by bacteria of the genus *Brucella*, is particularly relevant in this context, although investigation of this agent is not required in foods in Brazil according to the microbiological standards established by regulatory acts. Polymerase chain reaction (PCR) represents a promising tool for the detection of *Brucella* spp. in foods; however, its application depends on obtaining high-quality DNA and controlling interfering substances present in dairy products. The aim of this study was to determine the frequency of *Brucella* spp. in RMAC from nine producing regions in the states of Minas Gerais and Piauí, as well as to evaluate epidemiological factors potentially associated with the occurrence of the agent. A total of 222 RMAC samples were evaluated using different DNA extraction methodologies, from which a guanidinium thiocyanate-based protocol was selected and standardized. The detection of *Brucella* spp. was performed by nested PCR targeting the *eryD* gene, with samples considered positive when the expected 363-bp fragment was detected in the second reaction. Associated factors were evaluated using univariate and spatial statistical analyses, considering the production site, counts of total and fecal coliforms and coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS), the presence of *Coxiella burnetii*, the rainy season, ripening period, moisture content, and pH. Fragments of the *eryD* gene were detected in 24 samples (10.8%; 95% CI: 7.1–15.7%), distributed across four producing regions (Serro, Araxá, Canastra, and Piauí). In nine samples, only the 469-bp fragment was observed, even after the second reaction, and these results were considered inconclusive regarding the presence of the agent. The production site was significantly associated with the occurrence of *Brucella* spp. ($p < 0.0001$), as were CPS counts ($p = 0.03$). Odds Ratio (OR) analysis indicated a higher likelihood of positivity among samples with elevated CPS counts ($p = 0.04$). The frequency of positive samples decreased with increasing time elapsed since the official recognition of the regions as traditional cheese-producing areas by the state animal health authority ($p < 0.0001$). Spatial analyses identified two high-density clusters of positive samples, one in Minas Gerais and the other in Piauí. The results demonstrated the occurrence of *Brucella* spp. DNA in RMAC from different producing regions and reinforce the importance of

investigating this agent in foods produced with raw milk, contributing to the understanding of epidemiological aspects related to the production chain, strengthening surveillance and control actions, and implementing continuous educational initiatives with producers, under the One Health perspective.

Keywords: *Brucella* spp.; artisanal cheeses; raw milk; nested PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - 10 microrregiões produtoras de QMA oficialmente reconhecidas.....	25
Figura 2 - Fontes de infecção e vias de transmissão da brucelose bovina.....	35
Figura 3 - Representação do princípio da nested PCR.....	43
Quadro 1 - Códigos e respectivas regiões produtoras de queijo artesanal de leite cru.....	47
Figura 4 - Etapas do protocolo de extração de DNA à base de tiocianato de guanidina.....	49
Quadro 2 - Composição da reação de PCR e concentrações finais dos reagentes....	51
Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para avaliação da integridade do DNA extraído. Amostras de DNA extraídas a partir de diferentes protocolos foram aplicadas do poço 2 ao 11, com destaque para o poço 3, que corresponde ao DNA obtido pelo método à base de tiocianato de guanidina. (M) Marcadores de peso molecular aplicados nos poços 1 (λ) e 12 (1 kb - Promega®).....	56
Figura 6 - Perfil eletroforético dos produtos da nested PCR para detecção de <i>Brucella</i> spp. (A) Banda de 469 pb (poço 3) referente à primeira reação. (B) Banda de 363 pb (poço 3) referente à segunda reação. (1) Marcador de peso molecular (100 pb - Promega®). (2) NTC. (3) Cepa de campo T2, diluição 10^{-5} . (4) Cepa de campo T2, diluição 10^{-6} . (5) Cepa vacinal B19, diluição 10^{-5} . (6) Cepa vacinal B19, diluição 10^{-6} . (7) Amostra de DNA de queijo. (8) Poço sem amostra.....	57
Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da segunda reação de nested PCR para detecção de <i>Brucella</i> spp. em amostras de queijo. (A) NTC no poço 2, controle positivo no poço 3 e amostras testadas aplicadas nos poços 4 a 20. (B) Amostras testadas aplicadas nos poços 2 a 17, poços 18 a 20 sem amostras. (C) NTC no poço 1, controle positivo no poço 2, amostras testadas aplicadas nos poços 3 a 16. (M) Marcador de peso molecular (100 pb - Promega®).....	58
Gráfico 1 - Tendência linear inversa entre a proporção de queijos artesanais de leite cru positivos para <i>Brucella</i> spp. e os escores de tempo de reconhecimento (inclinação = $-0,0346$; $p < 0,0001$). Os escores 4, 14, 15 e 16 correspondem ao tempo decorrido (em anos) entre o reconhecimento oficial da região e a fabricação da amostra de queijo, Brasil, 2017 e 2018.....	62

Figura 8 - Distribuição espacial das ARF processadoras de QALC com resultados positivos e negativos para *Brucella* spp. em dois estados brasileiros, Minas Gerais e Piauí, nos anos de 2014, 2017, 2018 e 2022.....63

Figura 9 - Análise de EDK e densidade de clusters de *Brucella* spp. em ARF de Minas Gerais e Piauí, Brasil, e mapas coropléticos da distribuição de casos humanos e de amostras de queijo positivas. (B) Aplicação de EDK para QMA positivos para *Brucella* spp. em agroindústrias de oito regiões produtoras em Minas Gerais e uma região produtora de queijo artesanal de Coalho no estado do Piauí (E). Mapas coropléticos da distribuição de casos humanos de brucelose em Minas Gerais (C) e no Piauí (F), acumulados no período de 1998 a 2022. Mapas coropléticos da distribuição de QALC positivos para *Brucella* spp. em Minas Gerais (A) e no Piauí (D).....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise molecular de amostras de QALC.....	59
Tabela 2 - Análise univariada para positividade de <i>Brucella</i> spp. em queijos artesanais de leite cru, Brasil, 2014, 2017, 2018 e 2022.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARF	Agroindústrias Rurais Familiares
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCS	Contagem de Células Somáticas
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPP	Contagem em Placa Padrão
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DATASUS	Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
EDK	Estimativa de Densidade de Kernel
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução Normativa
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LFDA/MG	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais
LML	Laboratório de Microbiologia do Leite
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MRT	<i>Milk Ring Test</i>
NMP	Número Mais Provável
NTC	<i>No-Template Control</i>

OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
POP	Procedimento Operacional Padrão
QALC	Queijos Artesanais de Leite Cru
QMA	Queijo Minas Artesanal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TAL	Teste do Anel do Leite
TBE	Tris-borato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	OCORRÊNCIA E IMPACTO DAS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR	22
3.2	QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU NO CONTEXTO BRASILEIRO	23
3.2.1	Territorialidade e particularidades regionais dos queijos artesanais de leite cru	24
3.2.2	Marco regulatório dos queijos artesanais	26
3.3	SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU	26
3.4	BRUCELOSE	30
3.4.1	Histórico e descoberta do gênero <i>Brucella</i>	30
3.4.2	Características gerais de <i>Brucella</i> spp.	31
3.4.3	Aspectos epidemiológicos da brucelose	31
3.4.4	Brucelose humana	33
3.4.5	Brucelose bovina	34
3.4.6	Transmissão da brucelose	34
3.5	EXTRAÇÃO DE DNA EM MATRIZES COMPLEXAS: FUNDAMENTOS E LIMITAÇÕES	35
3.5.1	Tiocianato de Guanidina	36
3.5.2	Avaliação espectrofotométrica da qualidade do DNA	37
3.6	METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE <i>Brucella</i> spp. EM LEITE E DERIVADOS	38
3.6.1	Reação em cadeia da polimerase: Fundamentos e Princípios	40
3.6.1.1	<i>Nested PCR</i>	42

3.6.1.2	O alvo genético: gene <i>eryD</i>	43
3.6.1.3	Interferentes da PCR em matrizes lácteas: mecanismos e estratégias de mitigação	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	DESENHO, LOCAL DO ESTUDO E PLANEJAMENTO AMOSTRAL	46
4.2	ORIGEM, COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU	47
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM AMOSTRAS DE QUEIJO	48
4.4	PREPARAÇÃO DE CONTROLE POSITIVO A PARTIR DE CULTURAS DE <i>Brucella abortus</i>	50
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	50
4.5.1	Nested PCR direcionada ao gene <i>eryD</i>	51
4.5.2	Eletroforese em gel de agarose das reações	52
4.6	ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS E ESPACIAIS	52
5	RESULTADOS	55
5.1	PARÂMETROS DE CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO	55
5.2	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA APÓS EXTRAÇÃO	55
5.3	AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DO CONTROLE POSITIVO	56
5.4	RESULTADOS DA TESTAGEM DAS AMOSTRAS POR NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Brucella</i> spp.	57
5.4.1	Amplificação exclusiva do fragmento de 469 pb na nested PCR	59
5.5	FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE ESPACIAL DE <i>Brucella</i> spp.	59
6	DISCUSSÃO	65
6.1	MÉTODO DO TIOCIANATO DE GUANIDINA	65
6.2	OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E FATORES ASSOCIADOS À DETECÇÃO DE <i>Brucella</i> spp. EM QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU	65
6.2.1	Resultados inconclusivos na detecção molecular de <i>Brucella</i> spp.	69
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
8	FINANCIAMENTO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A produção de queijos artesanais de leite cru (QALC) representa uma atividade de expressiva relevância econômica, social e cultural no Brasil, especialmente em estados como Minas Gerais, onde esse alimento integra o patrimônio e a identidade de diversas comunidades rurais familiares (Benincá *et al.*, 2020; Sheleidres, 2025). Nos últimos anos, políticas públicas voltadas à valorização desses produtos, associadas ao reconhecimento de regiões produtoras e à implementação de certificações oficiais, ampliaram sua visibilidade e favoreceram sua inserção em mercados cada vez mais abrangentes (Brasil, 2019; Brasil, 2022c). Paralelamente, esse cenário reforça a necessidade de assegurar elevados padrões de qualidade microbiológica e inocuidade, uma vez que esses alimentos são produzidos sem tratamento térmico da matéria-prima e podem atuar como veículos de transmissão de agentes zoonóticos (Benincá *et al.*, 2020; Sheleidres, 2025).

Entre os microrganismos de importância para a saúde pública associados ao leite cru e seus derivados, o gênero *Brucella* merece destaque. A brucelose permanece entre as zoonoses bacterianas mais disseminadas no mundo e continua sendo considerada uma doença negligenciada, frequentemente subdiagnosticada e subnotificada (Santana *et al.*, 2020; Brasil, 2021; Bourdette; Sano, 2023).

A brucelose humana pode apresentar evolução prolongada e manifestações clínicas que comprometem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Quando não tratada adequadamente, a infecção pode evoluir para formas crônicas e apresentar complicações, incluindo artrite, endocardite e comprometimento neurológico. Além disso, episódios de recidiva podem ocorrer após o tratamento, especialmente nos primeiros meses, demandando acompanhamento clínico e, em alguns casos, novo tratamento. O manejo da doença requer antibioticoterapia combinada, geralmente por períodos prolongados, de no mínimo seis semanas, o que pode resultar em custos relacionados ao diagnóstico, tratamento e hospitalização, além de perdas de produtividade e absenteísmo laboral (Brasil, 2021; Brasil, 2025b).

Embora a principal via de infecção humana esteja relacionada à exposição ocupacional, a ingestão de leite cru e de derivados produzidos sem pasteurização representa uma importante via de transmissão alimentar, tornando os queijos artesanais um alimento de interesse para a vigilância epidemiológica (Silva *et al.*,

2018; Brasil, 2021). Apesar disso, a presença de *Brucella* spp. em queijos ainda é pouco investigada quando comparada à de outros microrganismos tradicionalmente monitorados nesse tipo de alimento, como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

No Brasil, a investigação de *Brucella* spp. não integra os padrões microbiológicos exigidos para alimentos estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 724/2022 (Brasil, 2022a) e pela Instrução Normativa (IN) nº 161/2022 (Brasil, 2022b). Consequentemente, informações sobre a ocorrência desse agente em queijos artesanais permanecem escassas, dificultando a estimativa de sua real frequência e a compreensão dos fatores relacionados à sua presença. Soma-se a isso a complexidade do diagnóstico microbiológico da brucelose, que exige infraestrutura laboratorial especializada e nível de biossegurança 3 (NB-3), o que limita sua aplicação em estudos de vigilância (Islam *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) representa uma ferramenta promissora para a detecção de *Brucella* spp. em matrizes alimentares complexas, como os queijos. Além da elevada sensibilidade e especificidade, essas técnicas possibilitam a identificação do DNA bacteriano independentemente da viabilidade do microrganismo, ampliando as possibilidades de investigação epidemiológica em alimentos produzidos a partir de leite cru (Paula *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2023). Entretanto, a obtenção de resultados confiáveis depende da adoção de protocolos eficientes de extração de DNA capazes de superar as limitações inerentes às matrizes lácteas, caracterizadas pela elevada concentração de lipídios, proteínas e compostos potencialmente inibidores da PCR (Benitez-Velásquez *et al.*, 2024; Pressure BioSciences, s.d.).

Diante desse cenário, o presente estudo propôs a padronização de um protocolo de extração de DNA e a detecção de *Brucella* spp. por nested PCR em QALC provenientes de diferentes regiões produtoras dos estados de Minas Gerais e do Piauí. Adicionalmente, buscou investigar fatores associados à ocorrência do agente, contribuindo para a compreensão de aspectos epidemiológicos relacionados à cadeia produtiva desses alimentos. Espera-se que os resultados obtidos ampliem o conhecimento sobre a ocorrência de *Brucella* spp. em queijos artesanais brasileiros, fornecendo subsídios científicos para o fortalecimento da vigilância em alimentos e para o aprimoramento das políticas públicas voltadas à segurança dos produtos lácteos. Além disso, os dados gerados poderão contribuir para futuras discussões

acerca da inclusão de patógenos zoonóticos negligenciados em programas de monitoramento microbiológico de alimentos, bem como para o desenvolvimento de estratégias integradas de prevenção, educação sanitária e controle, fundamentadas nos princípios de Uma Só Saúde (*One Health*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de *Brucella* spp. em QALC oriundos de nove regiões produtoras dos estados de Minas Gerais e Piauí e identificar potenciais fatores associados à presença do patógeno por meio de análises estatísticas univariadas e análises espaciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar metodologias, selecionar e padronizar um protocolo eficiente de extração de DNA total a partir de queijo artesanal de leite cru, uma matriz complexa, visando à obtenção de material genético com rendimento, pureza e integridade adequados para as reações moleculares subsequentes;
- Investigar a presença de *Brucella* spp. em 222 amostras de QALC por meio da técnica nested PCR direcionada ao gene *eryD*;
- Determinar a frequência de amostras positivas para *Brucella* spp. em nove regiões tradicionais produtoras de queijo avaliadas no estudo (oito em Minas Gerais e uma no Piauí);
- Avaliar fatores epidemiológicos potencialmente associados à ocorrência de *Brucella* spp. em QALC produzidos por agroindústrias rurais familiares (ARF), por meio de análises estatísticas univariadas e análises espaciais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresentada neste trabalho aborda aspectos relacionados às Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), com enfoque nos QALC, na sua segurança microbiológica e na ocorrência de *Brucella* spp., além dos fundamentos e metodologias aplicados à detecção desse patógeno em leite e derivados.

3.1 OCORRÊNCIA E IMPACTO DAS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR

A segurança de alimentos representa um dos temas centrais de destaque no contexto da saúde pública. Instituições como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos monitoram e divulgam regularmente dados referentes à incidência de DTHA, bem como aos agentes patogênicos envolvidos e aos surtos associados ao consumo de alimentos contaminados (Albert *et al.*, 2024).

De acordo com dados da OMS, aproximadamente 600 milhões de pessoas em todo o mundo, o que corresponde a quase uma em cada 10 pessoas, são acometidas por DTHA após consumo de alimentos contaminados, resultando em cerca de 420 mil óbitos anualmente. Destaca-se que 40% desses casos acometem crianças menores de cinco anos, com um total estimado de 125 mil mortes por ano. Do ponto de vista financeiro, anualmente, países de baixa e média renda enfrentam perdas econômicas estimadas em 110 bilhões de dólares, decorrentes de impactos na produtividade e de despesas médicas relacionadas à ingestão de alimentos contaminados ou impróprios para o consumo, em razão da potencial presença de perigos físicos, químicos ou biológicos (OMS, 2024; National Safety Institute, 2025).

Entre 2007 e 2020, o Brasil registrou, em média, 662 surtos anuais de DTHA, totalizando 156.691 pessoas afetadas, com uma média de 17 doentes por surto. Desses casos, 22.205 resultaram em hospitalizações e 152 óbitos foram contabilizados no período. Entretanto, esses dados podem subestimar a magnitude real das DTHA no país, considerando a ocorrência de subnotificação desses eventos, o que sugere que o número de pessoas acometidas possa ser superior ao registrado nos sistemas oficiais de vigilância (Brasil, 2021; Oliveira; Ferreira, 2021; Peresi *et al.*, 2024). O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), ferramenta

utilizada no país para o registro e o monitoramento de doenças e agravos de notificação compulsória, foi implementado gradualmente a partir de 1993 e regulamentado oficialmente em 1998 (Brasil, s.d.b).

Embora as DTHA desempenhem um papel significativo na morbidade e na mortalidade global, continuam sendo um tema frequentemente negligenciado. Essas enfermidades comprometem o desenvolvimento socioeconômico ao sobrecarregar os sistemas de saúde, impactar negativamente as economias nacionais e afetar setores como o turismo e o comércio. Os dados disponíveis evidenciam a necessidade de políticas públicas eficazes voltadas para a prevenção e para o controle dessas doenças. A segurança de alimentos, nesse contexto, representa uma responsabilidade coletiva que exige a colaboração entre diferentes autoridades nacionais e a adoção de uma abordagem multissetorial baseada no conceito de Uma Só Saúde (Albert *et al.*, 2024; OMS, 2024).

3.2 QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU NO CONTEXTO BRASILEIRO

Os QALC configuram-se como um elemento tradicional presente em diversas culturas ao redor do mundo, assumindo relevância não apenas alimentar, mas também social, cultural e econômica. No Brasil, sua produção representa uma prática histórica profundamente enraizada, responsável por preservar saberes locais e conectar gerações, aliada ao fortalecimento da identidade geográfica dos territórios produtores. Inserida majoritariamente no âmbito da agricultura familiar, essa atividade constitui importante fonte de renda em áreas rurais, contribuindo para a subsistência de inúmeras famílias. Nesse sentido, a fabricação desses queijos favorece a diversificação dos sistemas produtivos, amplia o valor agregado dos produtos lácteos e atua de forma estratégica no desenvolvimento regional, ao valorizar práticas tradicionais e reforçar a singularidade dos territórios (Benincá *et al.*, 2020; Sheleidres, 2025).

A relevância cultural dos QALC pode ser evidenciada por iniciativas de reconhecimento institucional que valorizam seus modos tradicionais de produção. No Brasil, destacam-se os queijos Minas artesanais (QMA) produzidos em regiões como Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre, cujos saberes e práticas foram reconhecidos como Patrimônio Cultural Imaterial pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) desde 2008. Esse reconhecimento ressalta a importância desses produtos como expressões culturais que transcendem o aspecto produtivo,

incorporando valores históricos, identitários e simbólicos associados aos territórios onde são elaborados (IPHAN, 2008; Brasil, 2024b).

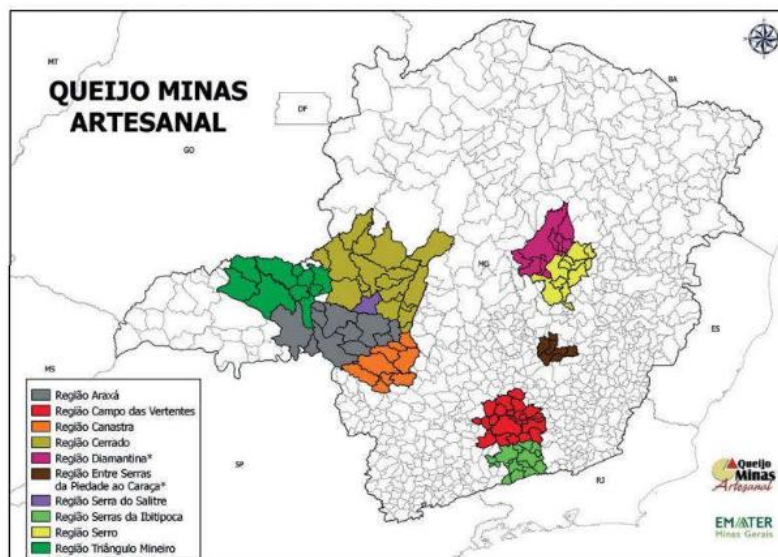
Mais recentemente, os Modos de Fazer o QMA alcançaram projeção internacional ao serem inscritos, em 2024, na Lista Representativa do Patrimônio Cultural Imaterial da Humanidade da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), após candidatura apresentada pelo IPHAN em 2023. Esse processo, articulado com entidades representativas e órgãos públicos, reforça o reconhecimento desses saberes como patrimônio coletivo, tornando o QMA um exemplo emblemático no contexto nacional quanto à valorização de práticas tradicionais associadas à produção de alimentos (Brasil, 2024b).

3.2.1 Territorialidade e particularidades regionais dos queijos artesanais de leite cru

A diversidade dos QALC no país decorre principalmente das particularidades regionais e das condições produtivas dos territórios onde são fabricados. Elaborados, em geral, em áreas delimitadas, esses alimentos incorporam características vinculadas a fatores como clima, altitude, relevo, solo e recursos hídricos, que influenciam diretamente a qualidade da matéria-prima. Nesse contexto, destaca-se o conceito de *terroir*, entendido como a expressão singular resultante da interação entre condições edafoclimáticas, práticas tradicionais e microbiota local, especialmente as bactérias lácticas, conferindo identidade própria a cada produto (Chaves *et al.*, 2021; Bastos *et al.*, 2024; Brasil, 2025a).

Como consequência dessas interações, os QALC apresentam variações físico-químicas e sensoriais que refletem tanto as condições geoclimáticas quanto os saberes locais. No cenário nacional, Minas Gerais ocupa posição de destaque, reunindo 10 microrregiões produtoras de QMA oficialmente reconhecidas, que compreendem Araxá, Campos das Vertentes, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Serras da Ibitipoca, Serro e Triângulo Mineiro, como ilustra a Figura 1 (Cardoso *et al.*, 2023; Bastos *et al.*, 2024).

Figura 1 - 10 microrregiões produtoras de QMA oficialmente reconhecidas



Fonte: Emater (2023).

Embora cada território apresente especificidades próprias, observa-se a presença de um elemento tecnológico comum, representado pelo uso do fermento endógeno denominado “pingo”, obtido a partir do soro de queijos produzidos anteriormente e constituído predominantemente por bactérias ácido-láticas e outros microrganismos adaptados às condições locais. Além de contribuir para as características sensoriais próprias dos queijos de cada região, sua atividade fermentativa promove a produção de ácido lático, favorecendo a redução do pH e podendo exercer efeito inibitório sobre microrganismos indesejáveis por meio da competição por nutrientes e da produção de substâncias antimicrobianas (Teodoro *et al.*, 2022; Cardoso *et al.*, 2023).

No Piauí, a produção artesanal de queijos apresenta estreita relação com a agricultura familiar, com destaque para o queijo de Coalho. Dados do Censo Agropecuário de 2006 indicaram a fabricação de 225 toneladas de queijo provenientes da agricultura familiar no estado, volume integralmente atribuído ao município de Luís Correia. Na região, a atividade está presente em comunidades rurais e constitui importante fonte de renda, com comercialização em circuitos locais e regionais, que alcançam municípios do Piauí e estados vizinhos (Araujo *et al.*, 2011). Um estudo realizado posteriormente na região de Parnaíba, Piauí, confirmou a permanência dessa atividade e sua relevância econômica para as famílias produtoras, com fabricação de aproximadamente 190 kg de queijo por dia, comercializados, em sua maior parte, no mesmo dia (Nascimento *et al.*, 2019).

3.2.2 Marco regulatório dos queijos artesanais

Conforme disposto na Lei Federal nº 13.860/2019 (Brasil, 2019), regulamentada pelo Decreto Federal nº 11.099/2022 (Brasil, 2022c), o queijo artesanal é definido como aquele obtido por meio de métodos tradicionais, com ênfase na valorização e na vinculação territorial, regional ou cultural. A sua produção deve seguir protocolos específicos de elaboração determinados para cada tipo e variedade, assegurando o emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação.

Nesse contexto, o Decreto Federal nº 11.099/2022 (Brasil, 2022c) estabeleceu os requisitos para a concessão dos selos de identificação destinados aos produtos artesanais de origem animal, entre eles o selo Arte e o selo Queijo Artesanal. O selo Arte é atribuído aos produtos elaborados de forma artesanal, com características e métodos próprios, tradicionais, culturais ou regionais, enquanto o selo Queijo Artesanal destina-se especificamente aos queijos produzidos segundo métodos tradicionais e vinculados à valorização territorial, regional ou cultural, conforme definido pela Lei nº 13.860/2019 (Brasil, 2019). Além de conferir reconhecimento oficial às especificidades desses produtos, a concessão dos selos possibilita sua comercialização em âmbito nacional, desde que associados ao selo do serviço oficial de inspeção, ampliando as oportunidades de mercado para a produção artesanal (Brasil, 2022c).

3.3 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU

Embora a legislação brasileira vigente estabeleça normas para a produção e comercialização de QALC (Brasil, 2019; Brasil, 2022c), ainda persistem questionamentos acerca da segurança microbiológica desses produtos. O leite cru, por não ser submetido à pasteurização, pode conter diferentes grupos de microrganismos, incluindo agentes patogênicos capazes de constituir riscos à saúde do consumidor. Ademais, esses alimentos demandam maior atenção quanto às condições higiênico-sanitárias ao longo da cadeia produtiva, uma vez que o processo de fabricação envolve intensa manipulação da matéria-prima e do produto final, aumentando a suscetibilidade à contaminação microbiológica. Dessa forma, a segurança de alimentos permanece como um dos principais pontos de debate relacionados aos queijos elaborados com leite cru (Benincá *et al.*, 2020; Malik; Fatima, 2021).

Estudos voltados à avaliação da qualidade microbiológica de queijos produzidos com leite não pasteurizado frequentemente relatam a presença de microrganismos patogênicos de relevância para a saúde pública, com destaque para bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*. Esses achados reforçam a preocupação relacionada às condições higiênico-sanitárias de processamento desses alimentos, visto que tais microrganismos podem atuar como indicadores de contaminação fecal e de falhas durante a fabricação dos queijos (Okura; Moacir, 2010).

Nesse contexto, Okura e Moacir (2010), ao analisarem 50 amostras de queijos produzidos com leite cru e não registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), provenientes de municípios do Triângulo Mineiro, observaram coliformes a 45 °C acima do limite estabelecido pela legislação ($\leq 5,0 \times 10^2$ NMP/g) em 72% das amostras avaliadas. Adicionalmente, entre os microrganismos da família Enterobacteriaceae identificados nas amostras, destacaram-se diferentes gêneros, incluindo *E. coli* (48,8%), *Proteus* (41,4%), *Providencia* (8,4%) e *Enterobacter* (1,4%). Esses resultados evidenciam a ampla disseminação de enterobactérias em produtos elaborados a partir de leite não pasteurizado.

Além das enterobactérias, relatos frequentes da presença de *Staphylococcus aureus* nesses produtos também são encontrados na literatura. Em um estudo conduzido com queijos coloniais da região Sul do Brasil, foram observadas contagens de *S. aureus* com valor acima do limite estabelecido pela legislação em todas as amostras analisadas (10^3 UFC/g) (Benincá et al., 2022). Achados semelhantes foram reportados em estudos internacionais, nos quais se verificou a ocorrência de Enterobacteriaceae, especialmente *E. coli*, bem como de estafilococos coagulase positivos em queijos produzidos a partir de leite cru (Serrano et al., 2018; Costanzo et al., 2020).

Entretanto, outros agentes etiológicos de relevância para a saúde pública também podem estar associados ao consumo de produtos elaborados com leite não pasteurizado, embora ainda recebam menor atenção científica quando comparados aos patógenos bacterianos tradicionalmente investigados (Silva et al., 2024). Entre esses microrganismos, destacam-se *Mycobacterium bovis*, *Coxiella burnetii* e espécies do gênero *Brucella*, reconhecidos pelo potencial zoonótico e pela capacidade de transmissão por alimentos de origem láctea (Silva et al., 2013; Silva et

al., 2018; Bezerra *et al.*, 2019; Béjaoui *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022; Duch *et al.*, 2025).

Nesse cenário, Silva *et al.* (2013), ao avaliarem 189 pacientes diagnosticados com tuberculose, identificaram três casos de coinfeção por *M. bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, dos quais dois estavam relacionados ao consumo de queijos produzidos a partir de leite cru. Os autores também observaram baixa prevalência de 1,6% de *M. bovis* entre os isolados analisados, sugerindo possível subestimação da frequência real desse agente pelos serviços de saúde locais e evidenciando a necessidade de maior vigilância epidemiológica voltada às enfermidades transmitidas por alimentos.

De maneira semelhante, Duch *et al.* (2025) investigaram amostras de QALC provenientes de diferentes regiões de Minas Gerais e do Piauí e identificaram 25% de positividade para *Coxiella burnetii*. A ocorrência do microrganismo foi mais frequente em amostras submetidas a períodos prolongados de maturação ($p < 0,01$), além de ter sido observada associação espacial entre áreas com produtos contaminados e a exposição humana à bactéria. Esses achados reforçam a importância do monitoramento microbiológico de derivados lácteos artesanais, especialmente sob a perspectiva integrada da abordagem Uma Só Saúde.

Estudos conduzidos no Brasil e em outros países têm demonstrado a ocorrência frequente de *Brucella* spp. em queijos elaborados sem pasteurização. Silva *et al.* (2018) identificaram positividade de 30,9% para *Brucella* spp. em amostras de QMA. Resultados semelhantes foram descritos por Bezerra *et al.* (2019), que confirmaram, por meio da técnica de PCR, a presença do gênero *Brucella* em 20% dos queijos artesanais comercializados no município de Parnaíba, Piauí. Posteriormente, Silva *et al.* (2022), ao avaliarem amostras de QMA provenientes da região do Serro, em Minas Gerais, detectaram DNA de *Brucella* spp. em 17 das 55 amostras analisadas, além de relatarem o isolamento de *Brucella abortus* viável em uma das amostras por cultivo microbiológico. No âmbito internacional, Béjaoui *et al.* (2022) também observaram elevada ocorrência desse microrganismo ao investigarem 102 amostras de queijo artesanal fresco provenientes de diferentes regiões da Tunísia, nas quais 69,6% apresentaram resultado positivo para *Brucella* spp.

A segurança microbiológica dos queijos elaborados com leite cru também está relacionada ao período de maturação. No âmbito federal, o período de 60 dias era estabelecido como referência para a maturação desses produtos (Brasil, 1996). A Instrução Normativa MAPA nº 30, de 7 de agosto de 2013 (Brasil, 2013), passou a

admitir a redução desse período, desde que estudos técnico-científicos comprovassem que a alteração não comprometeria a qualidade e a inocuidade dos queijos. A partir dessa possibilidade, estudos realizados em diferentes regiões de Minas Gerais subsidiaram a definição de períodos específicos de maturação pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), atualmente estabelecidos em 14, 17 ou 22 dias, conforme a região produtora (Minas Gerais, 2024a).

Embora esses estudos tenham fornecido subsídios importantes para a regulamentação dos períodos de maturação, sua avaliação da segurança microbiológica esteve predominantemente relacionada a microrganismos indicadores e patógenos tradicionalmente investigados em alimentos, não contemplando necessariamente agentes zoonóticos como *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis* e *Coxiella burnetii*. Essa limitação é relevante, uma vez que a maturação promove alterações de pH, atividade de água, umidade, concentração de sal e composição da microbiota, que podem reduzir a viabilidade de determinados microrganismos (Fonseca *et al.*, 2022), porém os efeitos dessas alterações podem variar de acordo com o agente e com as características do queijo (Starikoff *et al.*, 2016).

No caso de *Brucella* spp., evidências experimentais demonstram que a maturação pode reduzir a viabilidade do agente, porém o tempo necessário para sua eliminação pode variar conforme a carga inicial e as condições do processo. Em estudo experimental com QMA, Mussi (2018) observou ausência de *B. abortus* entre 8 e 15 dias de maturação quando utilizada menor concentração do patógeno, enquanto, para maior carga inicial, foram necessários entre 22 e 29 dias para que o agente não fosse mais detectado. Além disso, a detecção de *Brucella* spp. em QMA maturados e a recuperação de *B. abortus* viável em uma das amostras analisadas demonstram que a ocorrência do agente não pode ser desconsiderada mesmo em produtos submetidos à maturação (Silva *et al.*, 2022). Dessa forma, embora a maturação constitua uma importante barreira à sobrevivência microbiana, os períodos atualmente estabelecidos para diferentes regiões não devem ser interpretados, isoladamente, como garantia de eliminação de agentes zoonóticos cuja resistência e comportamento durante esse processo ainda não estejam suficientemente caracterizados.

Outro aspecto relevante relacionado à segurança microbiológica dos QALC refere-se à implementação do selo Arte e do selo Queijo Artesanal. Embora essas certificações representem avanços na valorização e ampliação da comercialização

desses produtos (Brasil, 2022c), sua presença pode transmitir ao consumidor uma percepção de segurança plena, ainda que produtos elaborados com leite não pasteurizado possam constituir riscos à saúde quando contaminados por agentes patogênicos (FDA, 2024). Diante disso, a certificação deve estar associada à manutenção de condições higiênico-sanitárias e microbiológicas adequadas ao longo da cadeia produtiva, de modo a reduzir as implicações para a saúde pública.

3.4 BRUCELOSE

Os tópicos seguintes abordarão a brucelose a partir de seu histórico, características gerais do gênero *Brucella*, aspectos epidemiológicos e mecanismos de transmissão, com enfoque nas manifestações clínicas humana e bovina.

3.4.1 Histórico e descoberta do gênero *Brucella*

Os primeiros relatos científicos relacionados à brucelose datam da segunda metade do século XIX, período em que a enfermidade passou a despertar maior interesse da comunidade acadêmica. Em 1859, o médico militar britânico Jeffery Allen Marston descreveu pela primeira vez as manifestações clínicas da doença em humanos, na ilha de Malta, denominando-a “febre gástrica remitente do Mediterrâneo”. Posteriormente, em 1887, o agente etiológico foi identificado por David Bruce, que isolou o microrganismo a partir do baço de um soldado falecido e o denominou *Micrococcus melitensis*. Esse achado representou um importante avanço para a compreensão da enfermidade, que passou a ser conhecida também como febre de Malta (Solera; Castaño, 2008).

Nos anos seguintes, importantes descobertas contribuíram para a elucidação da epidemiologia e das formas de transmissão da doença. Em 1897, o médico e veterinário dinamarquês Bernhard Bang identificou *B. abortus* ao investigar casos de aborto contagioso em bovinos na Dinamarca, enfermidade que posteriormente ficou conhecida como “doença de Bang”. Já em 1905, Themistocles Zammit demonstrou a presença da bactéria no sangue de cabras, enquanto William Horrocks detectou o microrganismo no leite desses animais, evidenciando o caráter zoonótico da brucelose e a importância do consumo de leite contaminado na transmissão da doença aos seres humanos (Solera; Castaño, 2008; Currier, s.d.).

Na década de 1920, a bacteriologista norte-americana Alice Catherine Evans estabeleceu a relação entre as espécies bacterianas identificadas em humanos e animais, propondo a denominação do gênero *Brucella* em homenagem a David Bruce. Ao longo do século XX, novas espécies foram sendo descritas em diferentes hospedeiros, como *Brucella ovis* em ovinos, *Brucella canis* em cães e, posteriormente, cepas isoladas de mamíferos marinhos. Essas descobertas ampliaram o entendimento sobre a diversidade do gênero *Brucella* e sua relevância tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública (Solera; Castaño, 2008; Currier, s.d.).

3.4.2 Características gerais de *Brucella* spp.

As bactérias do gênero *Brucella* pertencem à família Brucellaceae, ordem Rhizobiales e classe α -Proteobacteria, sendo caracterizadas como cocobacilos Gram-negativos intracelulares facultativos. Atualmente, são reconhecidas dez espécies integrantes do gênero, morfologicamente indistinguíveis entre si, cujas denominações são atribuídas de acordo com seus hospedeiros primários, como *B. abortus* em bovinos e *B. canis* em cães. Essas bactérias estão associadas principalmente a animais domésticos, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, suínos e caninos, sendo *B. abortus* a espécie de maior relevância no Brasil, responsável pela maioria das infecções, especialmente em razão da expressiva dimensão do rebanho bovino nacional. Estruturalmente, apresentam medidas variando entre 0,6 e 1,5 μm de comprimento e entre 0,5 e 0,7 μm de largura (Solera; Castaño, 2008; Ficht, 2010; Santana *et al.*, 2020; Possa *et al.*, 2021; Reboul *et al.*, 2021; Brasil, 2024a).

São bactérias aeróbias, imóveis, não hemolíticas, não esporuladas, não capsuladas e não toxigênicas, apresentando metabolismo predominantemente oxidativo. Em relação às características bioquímicas, são catalase positivas e geralmente oxidase positivas. Além disso, a maioria das espécies possui capacidade de reduzir nitrato a nitrito, com exceção de *B. ovis* e algumas cepas de *B. canis* (Solera; Castaño, 2008).

3.4.3 Aspectos epidemiológicos da brucelose

A brucelose é reconhecida como uma das zoonoses bacterianas mais disseminadas no mundo, apresentando ampla distribuição geográfica e epidemiologia dinâmica no espaço e no tempo. Trata-se de uma doença infecciosa causada por

bactérias do gênero *Brucella*, capazes de acometer diferentes espécies animais domésticas, silvestres e aquáticas, além dos seres humanos. Também conhecida como “Febre de Malta”, “Febre do Mediterrâneo” ou “Febre Ondulante”, a enfermidade possui relevância tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública, sendo considerada uma importante DTHA (Santana *et al.*, 2020; Brasil, 2021; Bourdette; Sano, 2023).

A brucelose apresenta caráter endêmico em diversas regiões do mundo, com maior prevalência observada em países da bacia do Mediterrâneo e Península Arábica. Entretanto, casos da doença já foram registrados em praticamente todos os continentes, demonstrando sua capacidade de adaptação a diferentes climas, ecossistemas, biomas e compartimentos ambientais. Além disso, a enfermidade está associada a impactos econômicos significativos, especialmente em países subdesenvolvidos e de baixa renda, devido às perdas produtivas nos rebanhos e aos prejuízos relacionados à saúde humana (Santana *et al.*, 2020; Bourdette; Sano, 2023; Padua; Leal, 2024).

Apesar de sua relevância epidemiológica, a brucelose permanece classificada entre as doenças negligenciadas, sendo frequentemente mal diagnosticada e subnotificada em diversos países, incluindo o Brasil. A limitada disponibilidade de informações diagnósticas contribui para a persistência da doença e dificulta a implementação de medidas efetivas de controle e vigilância. Dessa forma, a brucelose continua sendo considerada um importante problema de saúde pública mundial, demandando ações integradas entre os setores de saúde humana, animal e ambiental, no contexto de Uma Só Saúde (Santana *et al.*, 2020; Bourdette; Sano, 2023).

No Brasil, o controle da brucelose bovina integra as medidas preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que inclui a vacinação como importante estratégia sanitária. As vacinas oficialmente utilizadas no país são a B19, empregada na vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas com idade de 3 a 8 meses, e a RB51, aplicada exclusivamente em bovinos, ambas aprovadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (Brasil, 2024a).

A vacina B19, composta por cepa lisa atenuada de *B. abortus*, induz a produção de anticorpos específicos, podendo interferir nos testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose. Em contrapartida, a vacina RB51, produzida a partir de uma

cepa rugosa atenuada, não induz a formação de anticorpos anti-LPS liso, motivo pelo qual não é detectada pelos métodos laboratoriais sorológicos atualmente disponíveis no mercado, desenvolvidos para cepas lisas de *Brucella* spp. (Brasil, 2024a).

3.4.4 Brucelose humana

A brucelose humana caracteriza-se por um período de incubação variável, geralmente entre 5 e 60 dias, e por manifestações clínicas iniciais inespecíficas, o que dificulta seu diagnóstico diferencial. Trata-se de uma enfermidade multissistêmica que pode acometer diferentes órgãos, apresentando quadro clínico de início agudo ou insidioso. Os sintomas mais comuns incluem febre intermitente (quadro clássico), contínua ou remitente, sudorese noturna, calafrios, cefaleia, fadiga, mal-estar generalizado, mialgia, artralgia e perda de peso (Brasil, 2021). Em decorrência da semelhança clínica com outras doenças infecciosas, a brucelose é frequentemente subdiagnosticada, tornando a suspeita clínica um fator essencial para a solicitação de exames laboratoriais confirmatórios (Schmitt *et al.*, 2017; Brasil, s.d.a).

Além das manifestações sistêmicas predominantes, alguns pacientes podem apresentar sinais gastrointestinais, como náuseas, vômitos e desconforto abdominal, especialmente quando a infecção ocorre pela ingestão de leite não pasteurizado ou de produtos lácteos contaminados. Nessas circunstâncias, embora de forma menos frequente, podem ainda ser observadas complicações gastrointestinais mais graves, como ileíte, colite e peritonite bacteriana espontânea (Brasil, 2021).

Ademais, em casos mais graves ou na ausência de tratamento adequado, a doença pode evoluir para formas crônicas e debilitantes, com comprometimento dos sistemas nervoso, cardiovascular e musculoesquelético. Entre as principais complicações descritas estão endocardite, meningite, neurobrucelose, artrite e espondilite, podendo a enfermidade persistir por meses ou anos, ou até mesmo levar ao óbito. No Brasil, a brucelose apresenta importante caráter ocupacional, acometendo principalmente trabalhadores rurais, médicos veterinários, tratadores de animais, vacinadores e profissionais vinculados à cadeia produtiva de carne e leite (Brasil, 2021).

O tratamento da brucelose humana é realizado com antibioticoterapia combinada, devido à capacidade do agente de persistir no organismo e ao risco de falha terapêutica e recidiva. De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes

Terapêuticas do Ministério da Saúde, para adultos e crianças maiores de 10 anos, são recomendados esquemas à base de doxiciclina associada a aminoglicosídeos, como estreptomicina ou gentamicina, ou, alternativamente, doxiciclina associada à rifampicina, geralmente por 42 dias. O acompanhamento clínico após o tratamento deve ser mantido por, no mínimo, um ano, considerando a possibilidade de recidiva (Brasil, 2025b).

3.4.5 Brucelose bovina

Nos bovinos, a brucelose manifesta-se principalmente por distúrbios reprodutivos, sendo o aborto no terço final da gestação o principal sinal clínico da doença, frequentemente associado à retenção de placenta em decorrência de placentite necrótica. *B. abortus* apresenta tropismo pelo sistema reprodutivo e pela glândula mamária, onde pode estabelecer infecções persistentes. Essa afinidade está relacionada, entre outros fatores, à presença de eritritol em tecidos reprodutivos, particularmente na placenta e no útero gestante, favorecendo a multiplicação do agente nesses locais. A infecção da glândula mamária também possibilita a eliminação de *Brucella* spp. pelo leite, que pode constituir importante fonte de disseminação do agente (Xavier *et al.*, 2009; Barbier *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2023).

Em machos adultos, podem ocorrer orquite e epididimite, comprometendo a fertilidade dos animais. Embora os abortos tendam a diminuir após a primeira ocorrência devido ao desenvolvimento de resposta imunológica celular, outros impactos reprodutivos permanecem relevantes, como nascimento de bezerros fracos ou mortos. Dessa forma, além dos prejuízos econômicos à pecuária, a permanência de animais infectados nos rebanhos representa importante fonte de disseminação do agente e risco à saúde pública (Brasil, 2024a; Scharff; Meneguelli, 2024).

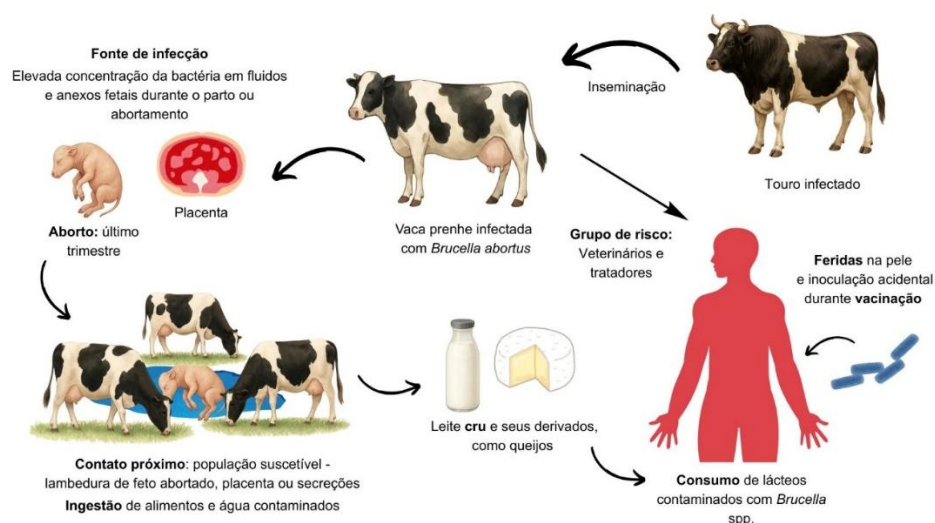
3.4.6 Transmissão da brucelose

A transmissão da brucelose ao ser humano ocorre principalmente por meio do contato direto ou indireto com animais infectados e seus produtos derivados. As principais vias de infecção estão relacionadas à exposição ocupacional, especialmente pelas vias respiratória e cutânea. Além disso, outras formas de transmissão menos frequentes incluem inoculação acidental do agente durante

procedimentos vacinais; transmissão perinatal, por via transplacentária, amamentação ou contato com secreções infectantes durante o parto; e, mais raramente, transmissão inter-humana por meio de relações sexuais, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos e tecidos (Brasil, 2021).

Entre as diferentes formas de transmissão, a via alimentar apresenta grande relevância para a saúde pública, especialmente devido ao consumo de leite cru e derivados lácteos produzidos sem tratamento térmico. Tais produtos, a exemplo do QALC, podem atuar como importantes veículos de disseminação de *Brucella* spp., representando risco potencial de infecção aos consumidores. Dessa forma, o controle sanitário da cadeia produtiva do leite e as boas práticas de fabricação constituem medidas fundamentais para a prevenção da brucelose humana (Silva *et al.*, 2018; Brasil, 2021). A Figura 2 ilustra as principais vias de transmissão da brucelose entre bovinos e humanos.

Figura 2 - Fontes de infecção e vias de transmissão da brucelose bovina



Fonte: Elaborado pela autora com base em informações de Torrico (2023).

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA EM MATRIZES COMPLEXAS: FUNDAMENTOS E LIMITAÇÕES

De acordo com a norma internacional ISO 24276:2006 (ISO, 2006), a extração de DNA é definida como a “separação do DNA dos demais componentes de uma amostra-teste”. A seleção do método deve considerar a natureza da matriz analisada, bem como a finalidade das análises posteriores. Nesse contexto, o objetivo central

desta fase metodológica é obter material genético em quantidade e pureza adequadas para as aplicações pretendidas (Prins *et al.*, 2024).

Independentemente da abordagem adotada, esse processo envolve etapas fundamentais. A etapa inicial consiste na lise celular por meios químicos, enzimáticos ou físicos, visando à ruptura das membranas e à liberação do conteúdo intracelular. Posteriormente, realiza-se a remoção de contaminantes, como proteínas, lipídios e RNA, por tratamentos específicos. Por fim, o material genético é precipitado, submetido à secagem e ressuscitado em solução apropriada, de forma a preservar sua integridade e viabilizar análises subsequentes (Cancellare *et al.*, 2021).

As metodologias disponíveis diferenciam-se principalmente quanto aos mecanismos de separação e purificação. A extração orgânica utiliza solventes, como fenol e clorofórmio, promovendo a separação de fases após centrifugação, na qual o DNA permanece na fase aquosa, enquanto proteínas e lipídios são transferidos para a fase orgânica. Em contraste, métodos não orgânicos, como o *salting out*, baseiam-se na precipitação de proteínas por elevadas concentrações salinas, mantendo o DNA em solução até sua recuperação por precipitação alcoólica. Por sua vez, abordagens fundamentadas na adsorção em fase sólida, como aquelas que empregam sílica ou partículas magnéticas, exploram a afinidade do DNA por superfícies sólidas na presença de sais caotrópicos, permitindo sua ligação, lavagem e posterior eluição, o que resulta em material com elevado grau de pureza (Gupta, 2019).

A extração de DNA a partir de matrizes como leite e queijo, consideradas biologicamente complexas, é frequentemente desafiadora em função dos elevados teores de lipídios e proteínas, que interferem nas etapas de lise celular e precipitação do material genético. Adicionalmente, a baixa celularidade dessas amostras resulta em menor rendimento de DNA quando comparado a outras matrizes. Além disso, a presença de enzimas, como lipases, proteases e nucleases, pode comprometer a integridade do DNA caso não sejam adequadamente inativadas por reagentes específicos (Benitez-Velásquez *et al.*, 2024; Pressure BioSciences, s.d.).

3.5.1 Tiocianato de Guanidina

Diante dessas limitações, torna-se fundamental a seleção criteriosa de reagentes e de abordagens capazes de garantir a obtenção de DNA com qualidade e quantidade adequadas para aplicações em biologia molecular, como a PCR. Nesse

contexto, a utilização de métodos baseados em tiocianato de guanidina destaca-se como uma estratégia robusta e amplamente empregada, uma vez que promove a lise celular, a desnaturação de proteínas e a inativação de nucleases, favorecendo a obtenção de material genético íntegro (BenchChem, 2025).

O tiocianato de guanidina atua como um potente agente caotrópico, capaz de desestabilizar macromoléculas por meio da ruptura de interações, como ligações de hidrogênio, em soluções aquosas. Essa propriedade permite a desnaturação eficiente de proteínas e enzimas degradativas, como DNases e RNases, que poderiam comprometer a integridade do DNA. Além disso, tampões de lise contendo esse composto promovem a solubilização dos constituintes celulares, liberando os ácidos nucleicos e protegendo-os contra degradação enzimática (BenchChem, 2025).

Devido a essas características, métodos baseados em tiocianato de guanidina têm sido amplamente aplicados na extração de ácidos nucleicos a partir de diferentes matrizes complexas, incluindo amostras clínicas, ambientais e forenses, bem como materiais de interesse virológico (BenchChem, 2025). Assim, sua aplicação em matrizes alimentares, como queijos e leite, mostra-se promissora, especialmente frente aos desafios inerentes a esse tipo de amostra (Duthoit *et al.*, 2003; Callon *et al.*, 2007; Delbès *et al.*, 2007). Dessa forma, sua capacidade de promover lise eficiente aliada à inativação de enzimas degradativas o torna uma alternativa viável e eficaz para protocolos de extração de DNA em diferentes contextos laboratoriais.

3.5.2 Avaliação espectrofotométrica da qualidade do DNA

A avaliação da qualidade do DNA extraído por espectrofotometria baseia-se na análise da absorbância da luz ultravioleta em diferentes comprimentos de onda, especialmente em 260, 280 e 230 nm. Os ácidos nucleicos apresentam máxima absorção em 260 nm, enquanto proteínas absorvem preferencialmente em 280 nm e, dessa forma, a razão A260/A280 é amplamente utilizada como indicador de pureza em relação à contaminação proteica. Para DNA genômico, valores próximos a 1,80 são considerados indicativos de alta pureza, ao passo que valores inferiores sugerem a presença de proteínas. No entanto, esse parâmetro deve ser interpretado com cautela, uma vez que sua sensibilidade pode variar conforme a concentração do DNA, sendo menos eficaz na detecção de contaminantes em amostras mais concentradas (Thermo Fisher Scientific, 2024; Koetsier; Cantor, 2025).

Adicionalmente, a razão A260/A230 é empregada para avaliar a presença de contaminantes químicos oriundos dos reagentes de extração e purificação, como sais caotrópicos, fenóis, detergentes e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que absorvem luz na faixa de 230 nm. Valores ideais situam-se, em geral, entre 1,80 e 2,20, sendo considerados mais sensíveis para detectar contaminação química do que a razão A260/A280. Reduções nessa razão indicam a presença residual desses compostos, os quais podem interferir em reações enzimáticas subsequentes, como a PCR, comprometendo a eficiência das análises moleculares. Assim, a interpretação conjunta das razões A260/A280 e A260/A230 constitui uma etapa essencial para a validação da qualidade do DNA antes de sua utilização em aplicações biotecnológicas (Thermo Fisher Scientific, 2024; Koetsier; Cantor, 2025).

3.6 METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM LEITE E DERIVADOS

A detecção de *Brucella* spp. em leite e derivados pode ser realizada por diferentes abordagens analíticas, que se distinguem quanto aos princípios metodológicos, sensibilidade, especificidade e aplicabilidade. De modo geral, essas metodologias compreendem técnicas microbiológicas, sorológicas e moleculares, cada uma com vantagens e limitações próprias, sendo frequentemente empregadas de forma complementar em estudos epidemiológicos e no diagnóstico da brucelose (Islam *et al.*, 2023).

Os métodos microbiológicos baseiam-se no cultivo e isolamento de *Brucella* spp. a partir das amostras analisadas. De acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) para cultivo e identificação do gênero *Brucella*, estabelecido pela União Europeia (EURL, 2021a), a semeadura de amostras de origem animal, incluindo leite e derivados, como queijos (Silva *et al.*, 2022), deve ocorrer em meios de cultura seletivos. Essa seletividade é essencial quando há possibilidade de contaminação por microrganismos interferentes, sendo obtida pela adição de antibióticos ou antifúngicos (EURL, 2021a) ou pelo uso de formulações comerciais, como o ágar ou caldo *Brucella* (Miyashiro, 2004).

As condições de incubação também são determinantes para o crescimento da bactéria. Considerando que algumas cepas apresentam dependência de CO₂, recomenda-se a inoculação de cada amostra em, no mínimo, quatro placas, sendo metade incubada em atmosfera ambiente e a outra metade em condições

enriquecidas com 5% a 10% de CO₂. A incubação é conduzida a 37 ± 2 °C, com o aparecimento de colônias em meios sólidos geralmente observado após três dias. A partir desse período, as culturas devem ser examinadas rotineiramente, preferencialmente até o décimo dia, de modo a possibilitar a detecção e o subcultivo de colônias suspeitas antes que sejam sobrepostas por contaminantes ou que as amostras sejam descartadas como negativas (EURL, 2021a).

As colônias de *Brucella* spp. apresentam morfologia característica, sendo tipicamente circulares, com diâmetro entre 1 mm e 2 mm, margens regulares, aspecto translúcido e coloração semelhante ao mel pálido quando observadas sob luz transmitida. Em observação superior, tendem a apresentar aspecto convexo e coloração branco-perolada (EURL, 2021a).

Apesar de serem considerados confirmatórios e padrão-ouro para o diagnóstico, os métodos microbiológicos apresentam limitações relevantes. Destacam-se a necessidade de microrganismos viáveis nas amostras testadas, o uso de meios de cultura específicos, bem como a exigência de infraestrutura com nível adequado de biossegurança (nível 3), devido ao risco de infecção ocupacional. Adicionalmente, fatores como condições apropriadas de armazenamento e transporte rápido das amostras são essenciais para o sucesso da técnica. A baixa sensibilidade em amostras com reduzida carga bacteriana, aliada ao tempo prolongado para obtenção de resultados, também restringe sua aplicabilidade (Dadar *et al.*, 2019; EURL, 2021a).

Entre os métodos sorológicos, destaca-se o teste do anel do leite (TAL; do inglês *Milk Ring Test*, MRT), amplamente empregado como ferramenta de triagem em programas de controle e vigilância epidemiológica da brucelose em rebanhos leiteiros. Essa prova baseia-se na interação entre anticorpos específicos presentes no leite e antígenos corados, geralmente com hematoxilina. Como os anticorpos anti-*Brucella* encontram-se predominantemente adsorvidos aos glóbulos de gordura, a reação antígeno-anticorpo resulta na formação de um anel colorido na camada de creme, que ascende à superfície durante o período de incubação (Paula *et al.*, 2015; EURL, 2021b).

No contexto de monitoramento sanitário, o TAL pode ser aplicado em amostras coletadas diretamente de tambores ou tanques de expansão, sendo particularmente útil em rebanhos certificados como livres da doença. Apesar de sua praticidade, custo relativamente baixo e aplicabilidade em larga escala, o método apresenta limitações

importantes, como a ocorrência de resultados falso-positivos associados à presença de outras infecções ou à vacinação com a cepa B19, preconizada pelo PNCEBT, bem como de resultados falso-negativos, que podem ocorrer em grandes populações devido ao efeito de diluição (Paula *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2022).

Os métodos moleculares, especialmente a PCR e suas variações, têm sido amplamente empregados na detecção direta do DNA de *Brucella* spp. em produtos lácteos. Essas técnicas se destacam pela elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação do material genético do agente mesmo em baixas concentrações e independentemente da viabilidade bacteriana, o que representa uma vantagem significativa em comparação aos métodos microbiológicos tradicionais. Além disso, sua aplicabilidade em diferentes matrizes, como leite, queijos, tecidos e secreções animais, bem como a possibilidade de processamento de um grande número de amostras, reforçam sua relevância em estudos epidemiológicos e no diagnóstico laboratorial (Paula *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2023).

3.6.1 Reação em cadeia da polimerase: Fundamentos e Princípios

A PCR é uma técnica amplamente utilizada em biologia molecular, que possibilita a amplificação exponencial de sequências específicas de DNA. Essa metodologia baseia-se na replicação *in vitro* de um segmento-alvo, permitindo a obtenção de um grande número de cópias, denominadas amplicons, mesmo a partir de amostras degradadas, submetidas a armazenamento prolongado ou com baixa concentração de DNA. Em função dessa elevada sensibilidade, a PCR tornou-se uma ferramenta fundamental para a detecção e análise de material genético (Lorenz, 2012; Kombo, 2025).

O desenvolvimento da PCR representou um avanço significativo na biologia molecular moderna. O conceito inicial foi proposto na década de 1970. Entretanto, a técnica foi efetivamente descrita e aplicada por Kary Mullis em 1985, durante seu trabalho na Cetus Corporation. Um marco essencial para sua consolidação foi a introdução de uma DNA polimerase termoestável, isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, denominada *Taq* DNA polimerase. Essa enzima apresenta resistência a altas temperaturas, o que possibilitou a automação do processo, tornando a técnica mais eficiente e reprodutível. Desde então, a PCR tem sido extensivamente

empregada em diagnóstico molecular, identificação de patógenos, análises genéticas e estudos forenses (Lorenz, 2012; Kombo, 2025).

A PCR fundamenta-se na repetição cíclica de três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão. Inicialmente, o DNA de dupla fita é submetido a altas temperaturas, promovendo a separação das fitas complementares. Em seguida, os primers se ligam a regiões específicas do DNA molde, delimitando o fragmento a ser amplificado. Por fim, a DNA polimerase sintetiza novas fitas a partir dos dNTPs disponíveis na reação. A execução controlada das etapas da PCR ocorre em termocicladores que, por meio de rápidas variações térmicas, permitem que a sucessão de ciclos resulte na amplificação exponencial do segmento-alvo (Lorenz, 2012; Kombo, 2025).

Para a execução da técnica, são necessários reagentes específicos, incluindo um conjunto de primers, DNA polimerase termoestável, dNTPs, tampão de reação, DNA molde e água estéril. Os primers, ou oligonucleotídeos iniciadores, são projetados para se anelar às regiões flanqueadoras da sequência-alvo, sendo responsáveis pela especificidade da amplificação. A eficiência da reação depende do equilíbrio adequado entre esses componentes, bem como da ausência de substâncias inibidoras (Lorenz, 2012; Kombo, 2025).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, é necessária a inclusão de controles nas reações de PCR. O controle positivo contém a sequência-alvo e atua como referência para avaliação do desempenho da reação, sendo constituído por material genético do organismo de interesse. O controle negativo contém ácido nucleico carreador, mas não a sequência-alvo, sendo utilizado para verificar a especificidade da reação, uma vez que a ocorrência de amplificação indica possível contaminação ou amplificação inespecífica. O controle sem molde (*no-template control* – NTC), também denominado branco, é preparado mediante substituição do DNA por água ou tampão, com a finalidade de detectar contaminações provenientes de reagentes ou do ambiente laboratorial (Bustin *et al.*, 2025).

A PCR convencional, embora largamente utilizada, pode apresentar limitações relacionadas à amplificação não específica, decorrente do anelamento de primers em regiões não intencionais do DNA molde. Esse fenômeno pode resultar em produtos indesejados, comprometendo a sensibilidade, a especificidade e a interpretação dos resultados. Nesse contexto, foram desenvolvidas variações da técnica com o objetivo de minimizar essas limitações e aumentar a eficiência da amplificação (Bello, 2023).

3.6.1.1 Nested PCR

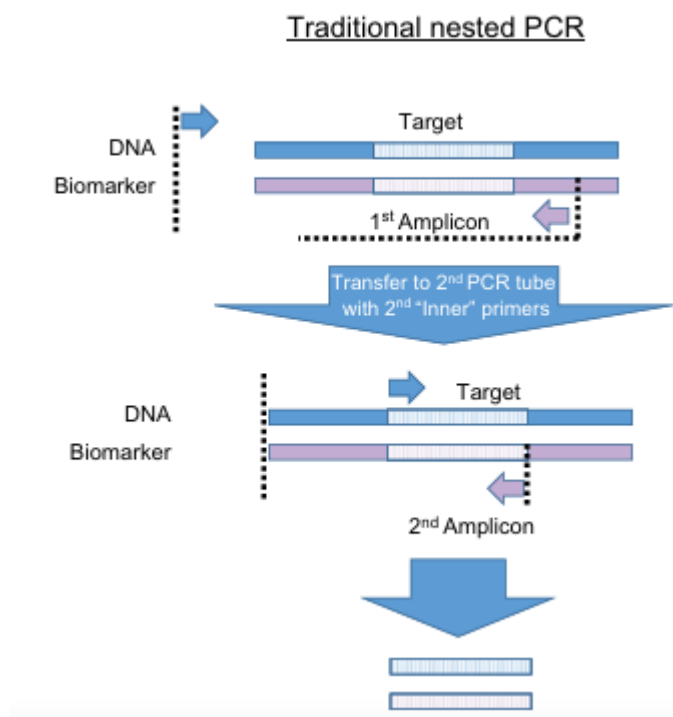
A PCR aninhada (nested PCR) configura-se como uma evolução da PCR convencional, desenhada para elevar os níveis de sensibilidade e especificidade ao reduzir a ocorrência de bandas inespecíficas. Essa abordagem baseia-se na realização de duas reações consecutivas, nas quais o produto da primeira amplificação é utilizado como molde para a segunda (Bello, 2023; Kombo, 2025).

Na etapa inicial, um primeiro conjunto de primers amplifica uma região mais ampla do DNA alvo, gerando um produto primário que contém a sequência de interesse. Em seguida, esse produto é submetido a uma segunda reação, utilizando um novo conjunto de primers, denominados internos, que se ligam a regiões localizadas dentro do fragmento previamente amplificado, conforme esquematizado na Figura 3. Esse processo sequencial atua como um mecanismo adicional de verificação, elevando a especificidade da reação e reduzindo significativamente a amplificação inespecífica (Izadi *et al.*, 2014; Shen, 2019; Bello, 2023).

A utilização de dois pares de oligonucleotídeos permite a realização de um maior número de ciclos de amplificação, aumentando a sensibilidade da técnica, especialmente na detecção de alvos presentes em baixas concentrações. Adicionalmente, essa estratégia contribui para a redução do ruído de fundo e da interferência causada por contaminantes ou substâncias inibidoras presentes na amostra, assegurando a obtenção de resultados mais confiáveis (Green; Sambrook, 2019; Shen, 2019; Bello, 2023).

Apesar dessas vantagens, a técnica apresenta vulnerabilidades, como o elevado risco de contaminação cruzada ou ambiental por aerossóis durante a transferência do produto entre as reações de PCR, o que exige rigoroso controle experimental e o emprego de boas práticas laboratoriais. Além disso, a realização de duas rodadas de amplificação pode aumentar a probabilidade de introdução de erros na sequência gerada. Assim, a aplicação da nested PCR requer planejamento cuidadoso, otimização das condições experimentais e adoção de medidas de controle de qualidade, a fim de garantir a acurácia dos resultados obtidos (Shen, 2019; Bello, 2023).

Figura 3 - Representação do princípio da nested PCR



Fonte: Shen (2019).

3.6.1.2 O alvo genético: gene *eryD*

Neste estudo, o gene *eryD* foi selecionado como alvo molecular por codificar um regulador transcricional fundamental no metabolismo do eritritol em *Brucella* spp. Esse gene encontra-se localizado no segundo cromossomo do microrganismo e integra o operon *eryABCD*, um conjunto de genes associado ao catabolismo desse carboidrato. Os produtos desse operon incluem a eritritol quinase (EryA), duas desidrogenases putativas (EryB e EryC) e o regulador EryD, responsável pelo controle preciso da expressão gênica nessa via metabólica (Rodríguez *et al.*, 2012; Tabibnejad *et al.*, 2016).

O gene *eryD* é considerado altamente conservado, estando presente na maioria dos isolados do gênero *Brucella*. Contudo, em cepas vacinais atenuadas, podem ocorrer alterações estruturais que comprometem sua identificação molecular. A cepa *Brucella abortus* B19, amplamente utilizada na vacinação bovina, apresenta uma deleção de aproximadamente 702 pares de bases no operon do eritritol, o que

afeta diretamente a região 3' do gene *eryC* e a região 5' de *eryD* (Sangari *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2012; Tabibnejad *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Gadhari *et al.*, 2025).

Essas modificações genéticas podem resultar na perda dos sítios de anelamento dos primers, impedindo a amplificação do alvo nessas linhagens específicas. Dessa forma, a visualização de bandas na nested PCR direcionada ao gene *eryD* confirma a detecção de *Brucella* spp. nas amostras analisadas. Por outro lado, a ausência de amplificação não deve ser interpretada isoladamente como um resultado negativo, pois pode indicar a presença de cepas vacinais, como a B19, que não são identificadas por este sistema devido às deleções na região alvo (Sangari *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2012; Tabibnejad *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Gadhari *et al.*, 2025).

3.6.1.3 Interferentes da PCR em matrizes lácteas: mecanismos e estratégias de mitigação

Produtos lácteos apresentam composição complexa, contendo substâncias que podem interferir no desempenho de técnicas moleculares, como a PCR. Entre os principais inibidores associados a essa matriz destacam-se lipídios, proteínas, íons cálcio e compostos residuais provenientes do processo de extração de DNA, como fenol, etanol e dodecilsulfato de sódio (SDS). Adicionalmente, enzimas proteolíticas, como a plasmina, bem como componentes oriundos de meios de cultura utilizados no enriquecimento microbiológico, também podem comprometer a eficiência da amplificação (Quigley *et al.*, 2012; Schrader *et al.*, 2012; Kase; Pfefer, 2016).

De modo geral, os inibidores de PCR formam um grupo heterogêneo de substâncias, predominantemente orgânicas, que atuam por diferentes mecanismos, afetando direta ou indiretamente a atividade da DNA polimerase (Schrader *et al.*, 2012). A gordura constitui um fator particularmente relevante em produtos como queijos e iogurtes, devido ao seu elevado teor lipídico. Embora seu efeito inibitório sobre a PCR já tenha sido demonstrado, sua ação pode variar conforme a composição da amostra e as condições experimentais (Kase; Pfefer, 2016).

Os íons cálcio, por sua vez, podem reduzir a eficiência da reação ao competir com o magnésio pelos sítios de ligação na DNA polimerase. Considerando a importância do magnésio como cofator essencial, sua indisponibilidade compromete a atividade enzimática. Ademais, proteases como a plasmina podem degradar a DNA

polimerase, ao passo que compostos orgânicos, como o fenol, promovem a desnaturação proteica desta enzima (Schrader *et al.*, 2012).

Estratégias podem ser empregadas para minimizar tais interferências. O incremento de magnésio na reação atenua o efeito dos íons cálcio. A atividade de proteases pode ser reduzida pela adição de agentes quelantes durante a extração de DNA, como o EDTA, que se ligam a íons metálicos bivalentes essenciais à atividade enzimática, impedindo a atuação destes como cofatores necessários à estabilização do sítio ativo e à catálise, o que resulta na inativação dessas enzimas. Dessa forma, a otimização das condições da PCR, especialmente quanto à composição da reação, aliada a protocolos eficientes de extração de DNA que considerem a presença de inibidores, é fundamental para a adequada execução dessa metodologia molecular (Schrader *et al.*, 2012; BenchChem, 2026).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenho do estudo, os procedimentos adotados para a obtenção das amostras, a extração de DNA, a preparação de controle positivo, a detecção de *Brucella* spp. por nested PCR e as análises epidemiológicas e espaciais empregadas neste estudo são descritos nos tópicos a seguir.

4.1 DESENHO, LOCAL DO ESTUDO E PLANEJAMENTO AMOSTRAL

Do conjunto de ARF distribuídas em nove regiões tradicionais produtoras de queijo, selecionou-se o total de 222 amostras de QALC obtidas ao longo dos anos de 2014, 2017, 2018 e 2022. A definição desse quantitativo e sua distribuição amostral visaram viabilizar estimativas representativas e confiáveis acerca da frequência e dos fatores associados à presença de *Brucella* spp. na população estudada. O delineamento compreendeu oito regiões de amostragem localizadas no estado de Minas Gerais, incluindo Serro, Triângulo Mineiro, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Araxá, Entre Serras da Piedade ao Caraça e Campo das Vertentes (n = 203); e uma região no estado do Piauí (n = 19). As ARF produzem os queijos a partir do leite obtido nas respectivas propriedades rurais onde estão estabelecidas.

Para fins de análise, as regiões produtoras foram codificadas de R1 a R9 de acordo com a ordem cronológica de seu reconhecimento oficial pelo órgão estadual de defesa agropecuária. As oito regiões de Minas Gerais receberam as codificações R1 a R8, sendo R1 a primeira região reconhecida oficialmente e R8 a mais recentemente reconhecida. A região do Piauí, codificada como R9, ainda não possuía reconhecimento oficial no período de realização das coletas e, portanto, atribuiu-se a ela um tempo igual a zero. Os códigos atribuídos às regiões produtoras estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Códigos e respectivas regiões produtoras de queijo artesanal de leite cru

Código	Região Produtora
R1	Serro
R2	Cerrado
R3	Araxá
R4	Canastra
R5	Campo das Vertentes
R6	Triângulo Mineiro
R7	Serra do Salitre
R8	Entre Serras da Piedade ao Caraça
R9	Piauí

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

4.2 ORIGEM, COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU

As amostras de QALC utilizadas na pesquisa molecular para detecção de *Brucella* spp. foram disponibilizadas pelo IMA e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), unidade Meio-Norte. As amostras cedidas pelo IMA são provenientes de coletas oficiais realizadas no âmbito das ações de fiscalização conduzidas pelo serviço de inspeção estadual.

A coleta, o acondicionamento e o transporte das amostras foram executados pelo serviço oficial de defesa agropecuária e pela Embrapa, em conformidade com procedimentos técnicos padronizados e previamente estabelecidos pelos respectivos órgãos. As amostras foram acondicionadas em embalagens apropriadas, identificadas individualmente e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sob refrigeração (4 °C), de modo a preservar suas características físico-químicas e microbiológicas.

Após a chegada aos laboratórios das instituições parceiras (IMA e Embrapa Meio-Norte), as amostras permaneceram sob condições controladas de armazenamento e, posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Leite (LML), da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, onde foram mantidas sob congelamento até a realização da extração de DNA e análises moleculares descritas a seguir.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM AMOSTRAS DE QUEIJO

A escolha do protocolo para extração de DNA total a partir de amostras de queijo baseou-se na necessidade de obtenção de material genético com qualidade e rendimento adequados para as análises subsequentes. Para isso, diferentes metodologias de extração foram previamente avaliadas, empregando distintos reagentes e condições experimentais.

Nesse contexto, foram testadas variadas composições e concentrações de tampão de lise alimentar, utilizado nas etapas iniciais de protocolos de extração de DNA a partir de alimentos, bem como diferentes enzimas, além da Proteinase K, incluindo RNase e lisozima. Também foram avaliadas substâncias capazes de promover a agregação e precipitação do DNA, como acetato de amônio, acetato de sódio, etanol e álcool isopropílico.

Adicionalmente, foi utilizado um kit comercial destinado à extração de ácidos nucleicos virais, baseado na tecnologia de *beads* magnéticas para purificação do material genético, com a finalidade de explorar alternativas que proporcionassem resultados satisfatórios quanto à pureza, quantidade e integridade do DNA.

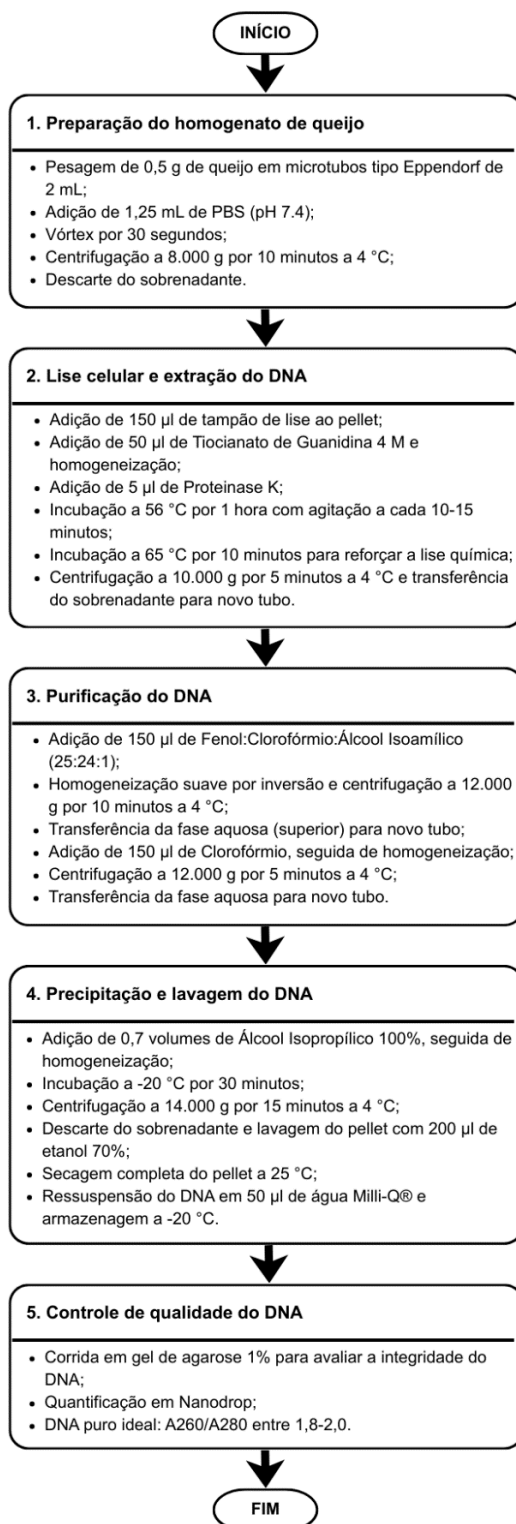
Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares, selecionou-se um protocolo de extração de DNA à base de tiocianato de guanidina, elaborado a partir da adaptação de metodologias descritas na literatura (Cocolin *et al.*, 2001; Duthoit *et al.*, 2003; Callon *et al.*, 2007; Delbès *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Ponzoni *et al.*, 2009).

Para a execução do procedimento, foram preparadas as seguintes soluções: solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4; tampão de lise composto por SDS a 2%, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a 2%, NaCl a 1,4 M, EDTA a 20 mM, Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0) e tiocianato de guanidina a 4 M; solução de tiocianato de guanidina a 4 M; proteinase K na concentração de 20 mg/mL; mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1); e etanol a 70%.

As etapas do protocolo de extração de DNA baseado em tiocianato de guanidina estão esquematizadas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do protocolo de extração de DNA à base de tiocianato de guanidina

Protocolo de extração de DNA à base de Tiocianato de Guanidina



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Ao final do procedimento, a qualidade e o rendimento das amostras foram avaliados por espectrofotometria em equipamento NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA). Adicionalmente, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do DNA, conduzida a 90 V, utilizando marcadores de peso molecular de 1 kb (Promega®, Madison, EUA) e λ .

4.4 PREPARAÇÃO DE CONTROLE POSITIVO A PARTIR DE CULTURAS DE *Brucella abortus*

Com a finalidade de obter um controle positivo para a PCR, foram utilizadas culturas inativadas de *B. abortus*, fornecidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG), integrante da rede do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). O material foi disponibilizado em volume de 10 mL, acondicionado em tubos do tipo Falcon e enviado sob refrigeração. Uma das culturas correspondia a uma cepa de campo desse microrganismo, identificada como “T2”, com concentração de $6,7 \times 10^{10}$ UFC/mL, enquanto a outra referia-se à cepa B19, com concentração de $5,01 \times 10^{10}$ UFC/mL.

Para utilização nas reações de PCR, foram realizadas diluições seriadas de ambas as culturas até 10^{-6} , atingindo concentrações da ordem de 10^4 UFC/mL. O monitoramento das diluições foi realizado segundo a escala de McFarland, que estima a concentração celular com base na turbidez das suspensões, por comparação visual com padrões estabelecidos. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas sob congelamento até o momento de uso.

Posteriormente, procedeu-se à nested PCR, conforme primers e condições descritos a seguir, com o objetivo de verificar a eficiência das diluições por meio da detecção de bandas de amplificação, viabilizando sua utilização como controle positivo nas reações aplicadas às amostras em estudo.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR foi empregada para a amplificação de sequências específicas de DNA, visando à detecção de *Brucella* spp. nas amostras analisadas. Para tal, foi adotada a estratégia de nested PCR direcionada ao gene *eryD*, conforme descrito a seguir.

4.5.1 Nested PCR direcionada ao gene *eryD*

A partir do DNA obtido na etapa 4.3, previamente quantificado e ajustado para a concentração aproximada de 40 ng/μL, procedeu-se à amplificação por PCR. Na primeira etapa da nested PCR, foram utilizados os primers Bru.eryD.469.F (5'-CTTCAACCATTTTGGCCATC-3') e Bru.eryD.469.R (5'-CTTGTCCATCAGGCTTTGCT-3'), visando à amplificação de um fragmento alvo de 469 pb. Na etapa subsequente, empregaram-se os primers Bru.eryD.363.F (5'-GCCGCTATTATGTGGACTGG-3') e Bru.eryD.363.R (5'-GATCGTAGTCGTCCGGGTTA-3'), destinados à amplificação de um fragmento de 363 pb (Silva *et al.*, 2018).

A nested PCR foi conduzida com a utilização de kit comercial de PCR (Promega®, Madison, EUA). Para cada uma das duas reações que compõem a técnica, foi adotado volume final de 25,0 μL por amostra. Os reagentes empregados, bem como suas concentrações nas soluções estoque e na reação, além de suas respectivas proporções no volume final, estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Composição da reação de PCR e concentrações finais dos reagentes

Reagente	Concentração na solução estoque	Concentração na reação	Volume (μL)
Água	-	q.s.p.	12,7
Tampão	5 X	1 X	5,0
MgCl ₂	25 mM	4 mM	4,0
dNTP (mix)	10 mM	0,08 mM	0,2
Primer Forward	10 μM	0,2 μM	0,5
Primer Reverse	10 μM	0,2 μM	0,5
Taq DNA Polimerase	5 U/μL	0,02 U/μL	0,1
DNA	40 ng/μL	3,2 ng/μL	2,0
Total			25,0

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Nota: q.s.p. = quantidade suficiente para.

O protocolo de termociclagem compreendeu uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por desnaturação a 95 °C por 40 segundos, anelamento a 60 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos, e finalizada por uma etapa de extensão a 72 °C por 4 minutos.

4.5.2 Eletroforese em gel de agarose das reações

As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Em cada poço, foram aplicados 20 µL por amostra. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1 X (0,09 M Tris base; 0,09 M ácido bórico; 0,1 mM EDTA, pH 8,0), sob voltagem inicial de 80 V até a migração das amostras e do marcador molecular para fora dos poços, seguida de aumento para 100 V. Adicionalmente, foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®, Madison, EUA) para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

Para a visualização dos resultados, os géis foram corados com brometo de etídio, e as bandas foram observadas sob luz ultravioleta, utilizando sistema de fotodocumentação.

4.6 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS E ESPACIAIS

A frequência de amostras de QALC positivas para *Brucella* spp. foi determinada adotando-se um intervalo de confiança (IC) de 95%, sendo este resultado utilizado como critério de triagem para a identificação de ARF positivas para o patógeno. A avaliação dos fatores associados à positividade dos queijos foi realizada por meio do teste qui-quadrado e, quando apropriado, do teste exato de Fisher, com o auxílio do software Epi Info (versão 3.5.1; CDC, Atlanta, EUA), fixando-se o nível de significância em 0,05.

Como parte desse delineamento, as amostras de QALC coletadas para este estudo foram submetidas a análises bacterianas, quantificação do teor de umidade (%) e pH, além do registro dos períodos de maturação. Para a execução das análises, as amostras foram categorizadas em contagens microbianas baixas (em conformidade) e altas (em desacordo) para os seguintes grupos: coliformes totais, coliformes termotolerantes (fecais) e SCP, de acordo com a legislação específica (Minas Gerais, 2024b).

A variável "período de maturação", originalmente coletada como uma variável quantitativa (medida em dias inteiros), foi posteriormente categorizada utilizando o valor da mediana (9 dias) como ponto de corte, sendo o mesmo procedimento seguido para as variáveis "grau de umidade" e "pH". A escolha da mediana, correspondente ao segundo quartil, reflete a tendência central dos dados e possibilita uma classificação binária equilibrada. Essa categorização foi elaborada especificamente

para subsidiar as duas principais abordagens estatísticas realizadas neste estudo: o teste qui-quadrado e as análises espaciais. O teste qui-quadrado requer variáveis categóricas e não pressupõe a normalidade dos dados, enquanto a análise espacial também aplica categorizações baseadas em quartis para variáveis quantitativas, tornando a mediana um ponto de referência consistente e metodologicamente adequado para ambas as etapas.

Para os queijos produzidos e coletados nos anos de 2017 e 2018 ($n = 99$), avaliou-se a potencial associação entre as proporções de positividade para *Brucella* spp. e o tempo decorrido desde o reconhecimento oficial da região até o momento da fabricação dos queijos. Essa análise de tendência linear foi executada na plataforma Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/trend>). A seleção exclusiva das amostras desse biênio justificou-se pela proximidade de suas datas de fabricação e coleta, o que resultou em um período homólogo de armazenamento sob congelamento e, conseqüentemente, no processamento e na manipulação laboratorial simultâneos.

Adicionalmente, procedeu-se à determinação do *Odds Ratio* (OR) para a variável "local de produção" na plataforma OpenEpi (versão 3.01; Dean AG, Sullivan KM, Soe MM), aplicando-se a correção de Haldane como fator estatístico de ajuste. O cálculo do OR foi restrito às variáveis que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

As malhas territoriais (unidades da federação, microrregiões e limites municipais) e os dados de população estimada foram obtidos junto ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (<https://www.ibge.gov.br/>). Para a avaliação espacial dos dados, foram empregadas três abordagens complementares: mapas coropléticos para a visualização da distribuição do número de amostras positivas por município; estimativa de densidade de Kernel (EDK) para delimitação de aglomerados de ocorrência de amostras positivas e de notificações humanas; e análises de varredura espacial (*Scan*) para a identificação de aglomerados espaciais com significância estatística.

A EDK foi aplicada para identificar a formação de aglomerados de ARF com QALC positivos para *Brucella* spp., utilizando função quadrática, cálculo de densidade e raio adaptativo. Complementarmente, a varredura espacial (*Scan*) foi realizada sob o modelo de Bernoulli (análise espacial pura) para detectar aglomerados estatisticamente significativos.

A elaboração dos mapas coropléticos foi conduzida no software ArcGIS (versão 10.4) (<https://www.arcgis.com/index.html>), categorizando a distribuição espacial dos casos em quartis nas classes: "Sem casos" (cor branca), "Baixo" (cor verde), "Médio" (cor amarela) e "Alto" (cor vermelha). O processamento, a modelagem e a visualização dos dados espaciais foram executados nos softwares ArcGIS, TerraView (<http://www.dpi.inpe.br/terralib5/wiki/doku.php>) e SaTScan (<https://www.satscan.org/>).

Por fim, para explorar potenciais sobreposições espaciais entre a ocorrência de *Brucella* spp. em queijos artesanais e a exposição humana ao patógeno, foram utilizados dados oficiais de notificação de casos humanos de brucelose registrados no Brasil (DATASUS/SINAN) abrangendo o período de 1998 a 2022. A partir desses dados, realizaram-se análises de aglomerados espaciais para mapear a distribuição e a concentração das notificações humanas nas regiões avaliadas. Em seguida, essas análises de aglomerados foram sobrepostas e comparadas espacialmente com os aglomerados de queijos identificados como positivos para *Brucella* spp., visando localizar áreas de concordância geográfica entre a contaminação do alimento e a ocorrência de casos humanos.

5 RESULTADOS

Os parâmetros de concentração e pureza do DNA extraído, bem como a avaliação de sua integridade, a seleção do controle positivo, os resultados da nested PCR direcionada ao gene *eryD* e os fatores epidemiológicos e espaciais associados à ocorrência de *Brucella* spp. são apresentados nos tópicos a seguir.

5.1 PARÂMETROS DE CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO

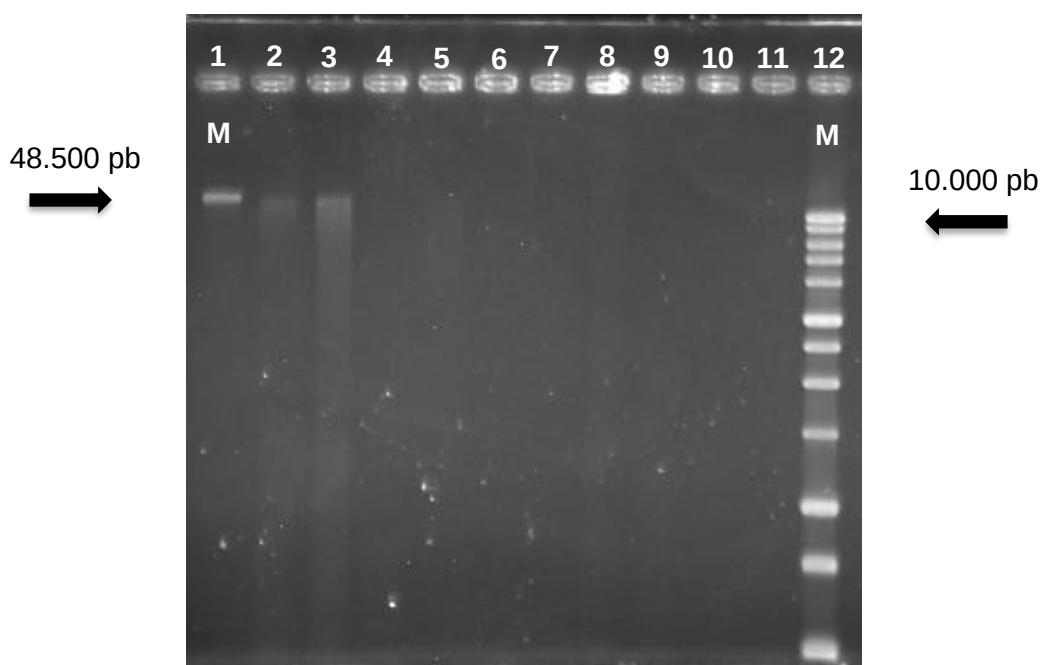
O Apêndice A apresenta os resultados da avaliação espectrofotométrica, realizada em NanoDrop™, dos parâmetros de concentração e pureza do DNA extraído das amostras.

5.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA APÓS EXTRAÇÃO

A Figura 5 apresenta o perfil eletroforético em gel de agarose a 1% do DNA obtido a partir da realização de diferentes métodos de extração. Nos poços 1 e 12, foram aplicados marcadores de peso molecular λ (lambda) e 1 kb, respectivamente. O marcador λ corresponde ao genoma completo do bacteriófago lambda, exibindo um fragmento de aproximadamente 48.502 pb; enquanto o marcador de 1 kb (Promega®, Madison, EUA) possui como limite superior um fragmento de aproximadamente 10.000 pb, permitindo a estimativa do tamanho dos fragmentos observados.

O poço 3 corresponde ao DNA obtido pelo método baseado em tiocianato de guanidina, o qual, dentre os procedimentos avaliados, apresentou melhor desempenho quanto à integridade e detectabilidade do material genético no gel, resultado também observado para a amostra aplicada no poço 2, proveniente de um protocolo de extração de DNA à base de fenol/clorofórmio. Com base nesses achados, a seleção do método mais adequado fundamentou-se na relação entre desempenho e viabilidade operacional, sendo priorizado o procedimento com tiocianato de guanidina em função de sua eficiência e custo-benefício.

Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para avaliação da integridade do DNA extraído. Amostras de DNA extraídas a partir de diferentes protocolos foram aplicadas do poço 2 ao 11, com destaque para o poço 3, que corresponde ao DNA obtido pelo método à base de tiocianato de guanidina. (M) Marcadores de peso molecular aplicados nos poços 1 (λ) e 12 (1 kb - Promega®)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

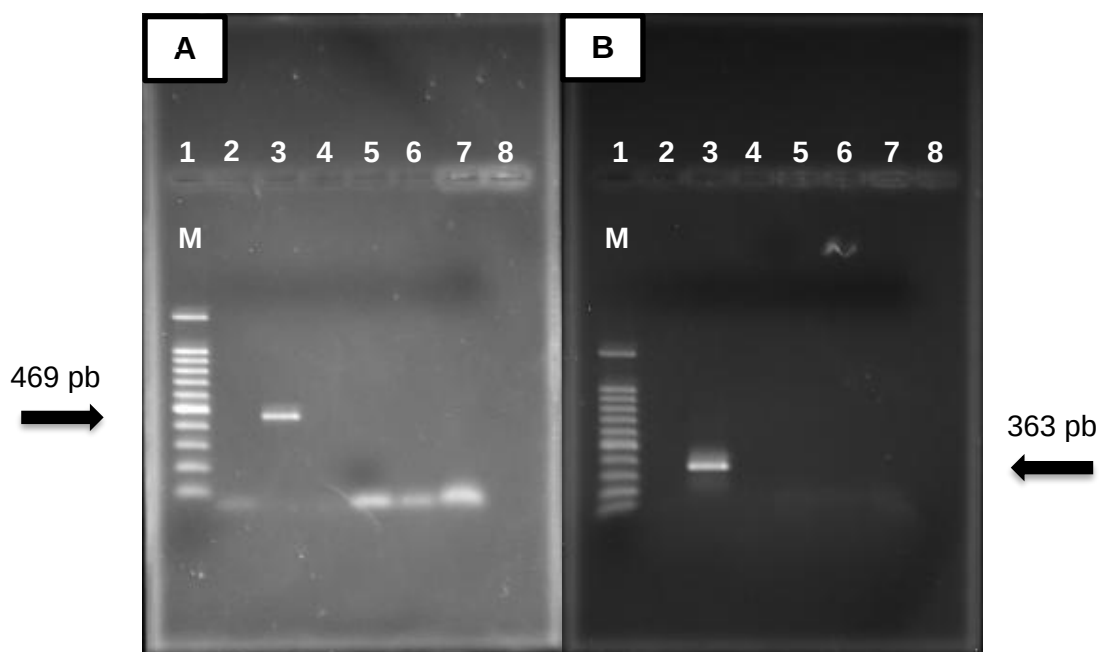
A presença de arraste ao longo do gel, observada nos poços 2 e 3, pode ser atribuída a fatores como a elevada quantidade de DNA aplicada, especialmente no poço 3, considerando a alta concentração obtida pelo método baseado em tiocianato de guanidina, frequentemente superior a 1.000 ng/ μ L. Adicionalmente, a ocorrência de fragmentação parcial do DNA, bem como a presença residual de compostos oriundos do processo de extração, podem contribuir para esse padrão. Esses fatores interferem na mobilidade eletroforética das moléculas, resultando no arraste observado.

5.3 AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DO CONTROLE POSITIVO

Previamente à submissão das amostras à nested PCR, os controles positivos preparados para as reações foram testados isoladamente. Tal etapa visou atestar a viabilidade do material e assegurar o uso racional dos reagentes, em observância ao princípio da parcimônia na gestão de recursos laboratoriais. A Figura 6 ilustra os

resultados desta avaliação, na qual a amostra de *Brucella abortus* (T2), na diluição 10^{-5} , exibiu os fragmentos esperados em ambas as etapas da reação: 469 pb na primeira amplificação e 363 pb na subsequente. Tais achados confirmam a aplicabilidade da amostra como controle positivo para o protocolo. No primeiro poço de cada gel, utilizou-se o marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®, Madison, EUA).

Figura 6 - Perfil eletroforético dos produtos da nested PCR para detecção de *Brucella* spp. (A) Banda de 469 pb (poço 3) referente à primeira reação. (B) Banda de 363 pb (poço 3) referente à segunda reação. (1) Marcador de peso molecular (100 pb - Promega®). (2) NTC. (3) Cepa de campo T2, diluição 10^{-5} . (4) Cepa de campo T2, diluição 10^{-6} . (5) Cepa vacinal B19, diluição 10^{-5} . (6) Cepa vacinal B19, diluição 10^{-6} . (7) Amostra de DNA de queijo. (8) Poço sem amostra

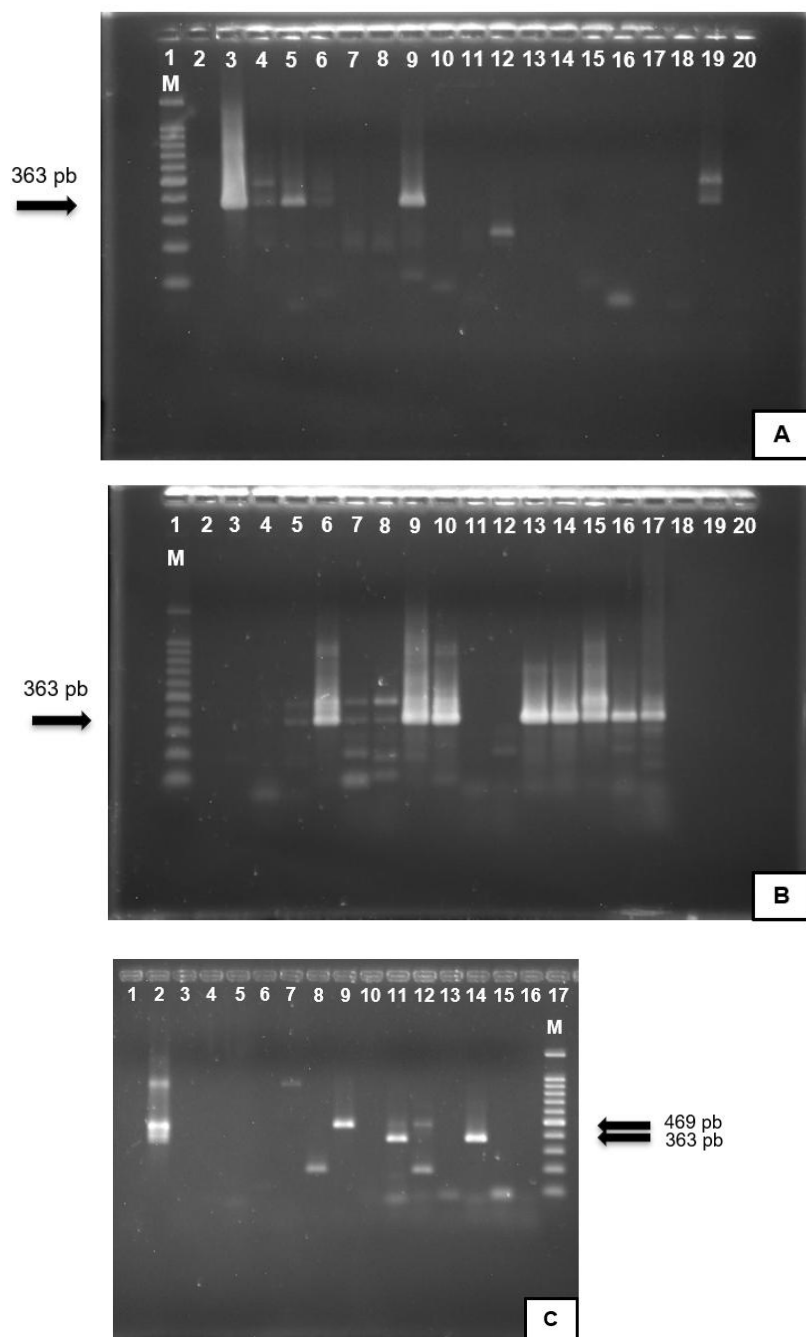


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.4 RESULTADOS DA TESTAGEM DAS AMOSTRAS POR NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE *Brucella* spp.

Os resultados da nested PCR direcionada ao gene *eryD* para detecção de *Brucella* spp. estão apresentados na Figura 7. As amostras foram consideradas positivas quando exibiram bandas de 363 pb em gel de agarose a 1,5%, após a segunda reação da técnica. Para comparação e estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®, Madison, EUA), aplicado no primeiro ou no último poço de cada gel.

Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% da segunda reação de nested PCR para detecção de *Brucella* spp. em amostras de queijo. (A) NTC no poço 2, controle positivo no poço 3 e amostras testadas aplicadas nos poços 4 a 20. (B) Amostras testadas aplicadas nos poços 2 a 17, poços 18 a 20 sem amostras. (C) NTC no poço 1, controle positivo no poço 2, amostras testadas aplicadas nos poços 3 a 16. (M) Marcador de peso molecular (100 pb - Promega®)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Não se constatou evidência de inibição da PCR, conforme demonstrado pela amplificação bem-sucedida do DNA de *Brucella* spp. nas amostras de queijo naturalmente positivas intercaladas entre as amostras testadas. Fragmentos do gene *eryD* de *Brucella* spp. foram detectados em 24 amostras de QALC (10,8%; IC 95%: 7,1–15,7%), como demonstra a Tabela 1.

5.4.1 Amplificação exclusiva do fragmento de 469 pb na nested PCR

Em nove amostras submetidas à nested PCR, observou-se exclusivamente a presença do fragmento de 469 pb, mesmo após a segunda reação, conforme ilustrado na Figura 7C, nos poços 9 e 12. Tais amostras foram computadas como negativas, compondo o grupo que apresentou apenas o amplicon precursor ou ausência de bandas, de acordo com o descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da análise molecular de amostras de QALC

Categoria da Amostra	Perfil Eletroforético	N.º de Amostras	Percentual (%)
Positiva	Presença de banda de 363 pb	24	10,81
Negativa	Apenas banda de 469 pb	9	4,05
Negativa	Ausência dos fragmentos esperados	189	85,14
Total		222	100

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

5.5 FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE ESPACIAL DE *Brucella* spp.

A distribuição da frequência de amostras de QALC positivas para *Brucella* spp. em relação às variáveis explicativas avaliadas está apresentada na Tabela 2. Os locais de produção e as contagens de SCP apresentaram associação estatisticamente significativa com a positividade para *Brucella* spp. ($p < 0,05$). Entre as regiões avaliadas, a R9 apresentou a maior frequência de amostras positivas, seguida pelas regiões R3, R1 e R4. Em contrapartida, não foram identificadas amostras positivas nas regiões R2, R5, R6, R7 e R8.

Adicionalmente, embora sem atingir significância estatística ao nível de 5% ($p = 0,09$), observou-se uma tendência de maior positividade para *Brucella* spp. em

amostras que apresentaram contagens mais elevadas de coliformes totais (UFC/g) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise univariada para positividade de *Brucella* spp. em queijos artesanais de leite cru, Brasil, 2014, 2017, 2018 e 2022

Variáveis	Total	Positivos (%)	Odds Ratio (IC 95%)	Valor p
Local de produção				< 0,0001
R1	135	10 (7,40)	3,43	
R2	10	0 (00,00)	1,00	
R3	13	1 (7,70)	4,92	
R4	25	1 (4,00)	2,51	
R5	10	0 (00,00)	1,00	
R6	6	0 (00,00)	3,15	
R7	1	0 (00,00)	13,67	
R8	3	0 (00,00)	5,86	
R9	19	12 (63,20)	68,33	
Coliformes totais (UFC/g) ^{a,b}				0,09
10 a 5.000	136	6 (4,40)	-	
5.100 a 15.000.000	56	6 (10,70)	-	
Coliformes fecais (UFC/g) ^{a,b}				0,41
1 a 500	155	9 (5,80)	-	
600 a 1.500.000	37	3 (8,10)	-	
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) ^{a,b}				0,03
10 a 10 ³	119	4 (3,40)	1,00	
> 10 ³	73	8 (11,00)	3,53 (1,02-12,20)	

<i>Coxiella burnetii</i> ^b				0,56
Não	124	18 (14,50)	-	
Sim	30	4 (13,30)	-	
Época de chuvas ^b				0,37
Não	118	15 (12,70)	-	
Sim	99	8 (8,10)	-	
Período de maturação (dias) ^b				0,13
0 a 9	80	15 (18,80)	-	
10 a 46	77	7 (9,10)	-	
Grau de umidade (%) ^{a,b}				0,37
20,39 a 40,65	95	4 (4,20)	-	
40,72 a 58,10	95	8 (8,40)	-	
pH ^{a,b}				0,57
4,00 a 4,89	62	4 (6,50)	-	
4,90 a 5,36	55	4 (7,30)	-	

^a Análises não realizadas nos queijos de Coalho, Piauí; ^b análises não realizadas em todas as amostras de QMA.

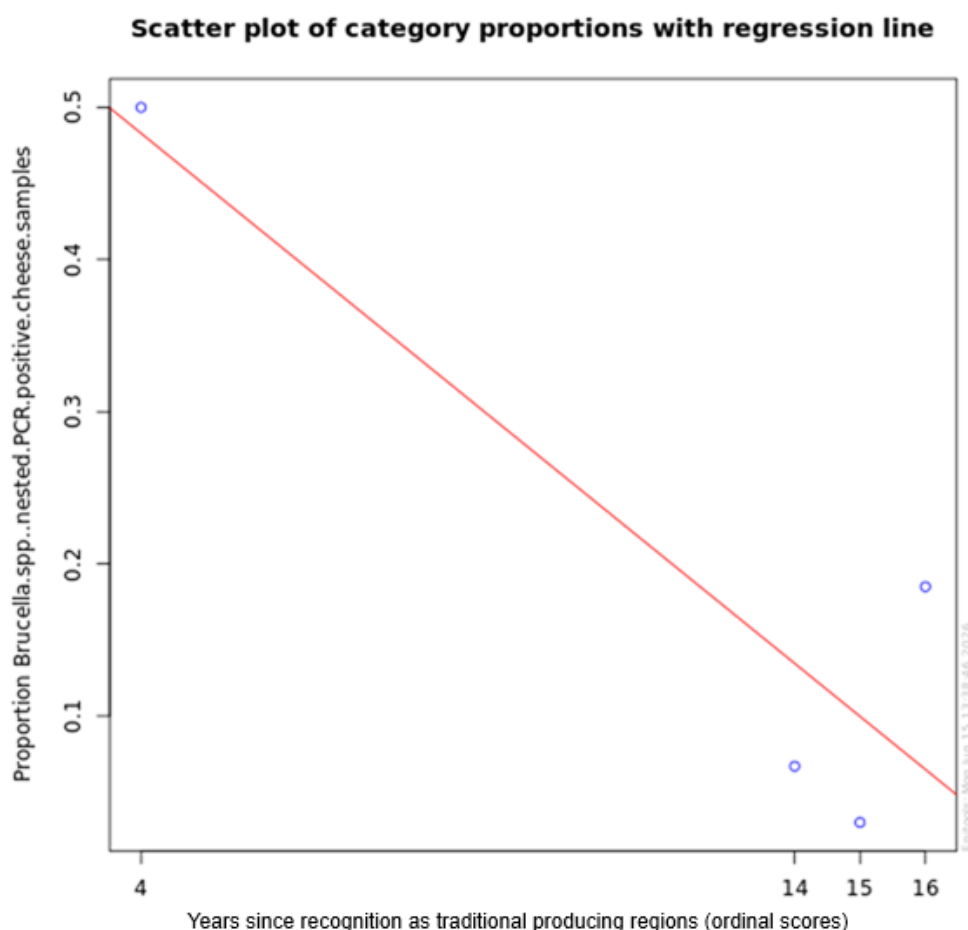
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise de OR confirmou a força da associação entre as contagens de SCP e a presença de *Brucella* spp. Os queijos classificados como impróprios para o consumo devido a altas contagens de SCP, de acordo com a legislação (Minas Gerais, 2024b), apresentaram uma chance de positividade para *Brucella* spp. de 3,53 vezes a do grupo de referência com baixas contagens de SCP (OR = 3,53; IC 95%: 1,02-12,20; $p = 0,04$). Quanto ao local de produção, a região R9, que registrou a maior frequência de contaminação (63,20%), apresentou uma chance de ocorrência de *Brucella* spp. de 68,33 vezes a das regiões R2 e R5, onde nenhuma amostra positiva foi detectada (OR = 68,33; $p < 0,0000001$) (Tabela 2).

A frequência de amostras de QALC positivas para *Brucella* spp. diminuiu progressivamente com o aumento do tempo transcorrido desde o reconhecimento

oficial das regiões como tradicionais produtoras de queijo pelo órgão estadual de defesa agropecuária. Essa tendência linear decrescente foi estatisticamente significativa (inclinação = $-0,0346$; $p < 0,0001$), indicando uma redução estimada de 3,46 pontos percentuais na frequência de positividade para cada ano adicional após o reconhecimento da região (Gráfico 1).

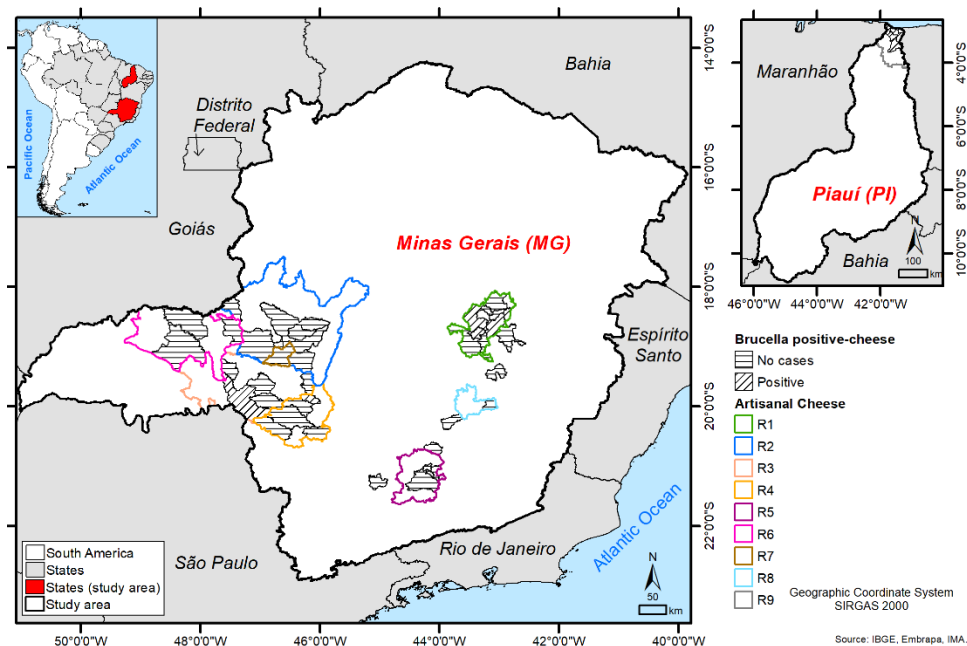
Gráfico 1 - Tendência linear inversa entre a proporção de queijos artesanais de leite cru positivos para *Brucella* spp. e os escores de tempo de reconhecimento (inclinação = $-0,0346$; $p < 0,0001$). Os escores 4, 14, 15 e 16 correspondem ao tempo decorrido (em anos) entre o reconhecimento oficial da região e a fabricação da amostra de queijo, Brasil, 2017 e 2018



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A Figura 8 apresenta a distribuição espacial das ARF processadoras de QALC de Minas Gerais e do Piauí, com resultados positivos e negativos para *Brucella* spp.

Figura 8 - Distribuição espacial das ARF processadoras de QALC com resultados positivos e negativos para *Brucella* spp. em dois estados brasileiros, Minas Gerais e Piauí, nos anos de 2014, 2017, 2018 e 2022

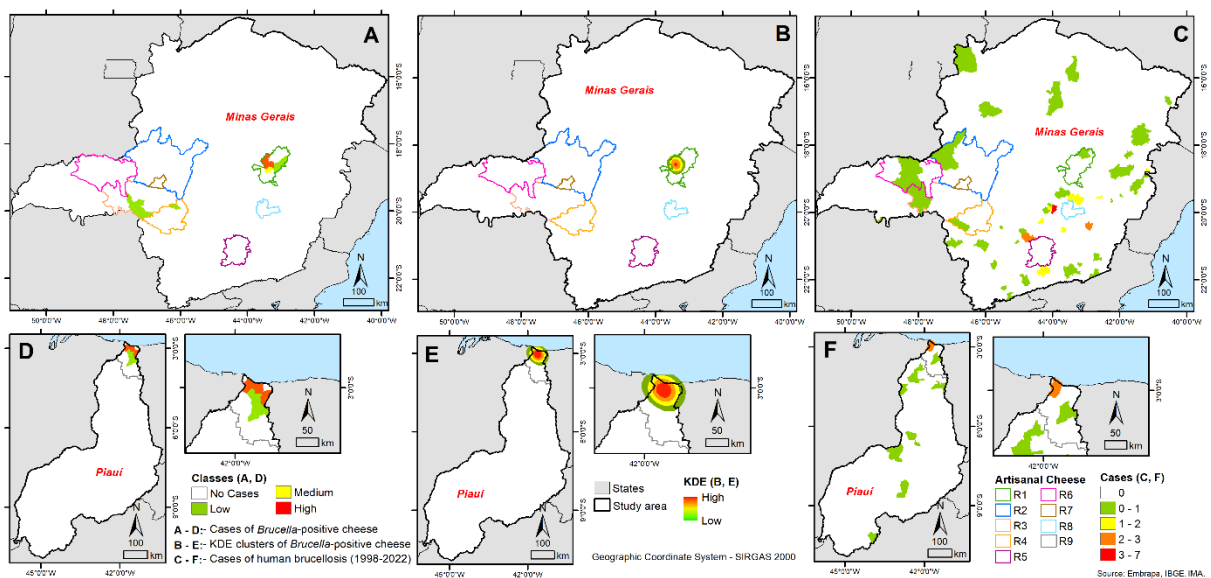


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A Figura 9 mostra a ocorrência de dois clusters de alta densidade, identificados por EDK, para QALC positivos para *Brucella* spp. em ARF de uma região produtora de QMA, localizada em Minas Gerais (B), e em uma região produtora de queijo artesanal de Coalho, no estado do Piauí (E). Os mapas coropléticos evidenciam municípios com relatos de casos humanos de brucelose nas faixas de 0 a 1 e de 2 a 3 casos notificados no período de 1998 a 2022 na região produtora R9 (Figura 9F), que também apresentou, de forma sobreposta, ARF produtoras de queijos positivos para *Brucella* spp. (Figura 9D).

Figura 9 - Análise de EDK e densidade de clusters de *Brucella* spp. em ARF de Minas Gerais e Piauí, Brasil, e mapas coropléticos da distribuição de casos humanos e de amostras de queijo positivas. (B) Aplicação de EDK para QMA positivos para *Brucella* spp. em agroindústrias de oito regiões produtoras em Minas Gerais e uma região produtora de queijo artesanal de Coalho no estado do Piauí (E). Mapas coropléticos da distribuição de casos humanos de brucelose em Minas Gerais (C) e no Piauí (F), acumulados no período de 1998 a 2022. Mapas coropléticos da distribuição de QALC positivos para *Brucella* spp. em Minas Gerais (A) e no Piauí

(D)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

6 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados contempla, inicialmente, a eficiência do método de extração de DNA empregado e, posteriormente, a ocorrência de *Brucella* spp. nos QALC, sua distribuição espacial, os fatores associados à sua detecção e os resultados inconclusivos observados na análise molecular.

6.1 MÉTODO DO TIOCIANATO DE GUANIDINA

A aplicação do método baseado em tiocianato de guanidina na extração de DNA a partir de queijo artesanal produzido com leite cru evidencia sua eficácia frente às limitações inerentes a matrizes lácteas complexas. Esse tipo de alimento apresenta elevada concentração de lipídios e proteínas, como a caseína, que frequentemente dificultam as etapas de lise celular e purificação do material genético (Benitez-Velásquez *et al.*, 2024; Pressure BioSciences, s.d.). Ainda assim, a observação de bandas de elevado tamanho molecular no gel de agarose, próximas à posição do marcador λ , indica que o procedimento foi eficaz na obtenção de DNA com adequada integridade estrutural.

Embora os valores médios da razão A260/A280 tenham variado entre 1,43 e 1,76, situando-se abaixo do intervalo considerado ideal ($\approx 1,80$) (Thermo Fisher Scientific, 2024; Koetsier; Cantor, 2025), o material obtido mostrou-se apto, permitindo a detecção de *Brucella* spp. por nested PCR.

Esse desempenho pode estar relacionado às elevadas concentrações de DNA obtidas a partir dos queijos, que possibilitaram a diluição das amostras antes das análises. A diluição constitui uma estratégia clássica em biologia molecular para mitigar a ação de inibidores da PCR, especialmente em matrizes complexas, como produtos lácteos (Wang *et al.*, 2017; Sidstedt *et al.*, 2020). Dessa forma, os resultados demonstram que o método baseado em tiocianato de guanidina foi suficientemente robusto para a obtenção de DNA adequado à aplicação em diagnóstico molecular, mesmo em condições desafiadoras.

6.2 OCORRÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E FATORES ASSOCIADOS À DETECÇÃO DE *Brucella* spp. EM QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU

O DNA de *Brucella* spp. foi detectado em 10,8% das amostras de queijo analisadas (IC 95%: 7,1–15,7%), com ocorrência em quatro regiões (Serro, Araxá,

Canastra e Piauí). No cenário nacional, investigações prévias apontaram frequências de positividade semelhantes em queijos, como os 13,16% observados em São Paulo (Kobayashi *et al.*, 2017) e os 20,00% na região da Parnaíba, Piauí, identificados por isolamento e confirmados por PCR em amostras coletadas em diferentes pontos de comercialização (Bezerra *et al.*, 2019). Em produtos informais, caracterizados pela produção e comercialização à margem do sistema oficial de inspeção sanitária, a presença do patógeno atingiu 19,27% em amostras de São Paulo e Minas Gerais (Miyashiro *et al.*, 2007) e 21,21% em queijos de leite bovino e bubalino, em sua maioria comercializados sem inspeção oficial, na Amazônia brasileira, abrangendo o Pará, Amapá e Rondônia (Silva *et al.*, 2016).

No presente estudo, a região do Serro (MG) apresentou 7,40% de amostras positivas para a bactéria ($n = 135$), valor inferior aos 30,90% reportados anteriormente em QMA nessa mesma localidade ($n = 55$) (Silva *et al.*, 2022). Em contrapartida, a região R9, correspondente ao estado do Piauí, destacou-se com a maior proporção de detecção do gênero entre as áreas avaliadas (63,20%). Esse percentual supera os 22,50% constatados em queijos tradicionais de leite cru na Turquia (Altun *et al.*, 2016), mas assemelha-se aos achados em produtos tradicionais do Irã (60,86%) (Izadi *et al.*, 2014) e em queijos frescos artesanais da Tunísia (69,60%) (Béjaoui *et al.*, 2022).

Diante da variabilidade observada nesses cenários, este se consolida como um dos estudos mais abrangentes sobre *Brucella* spp. em QALC até o momento no Brasil, destacando-se tanto pela dimensão amostral e temporal (número de amostras e anos de coleta) quanto pela abrangência geográfica. Não obstante, as investigações sobre esse patógeno em território nacional permanecem limitadas. Em âmbito global, a brucelose configura-se como uma grande preocupação de saúde pública, com uma estimativa conservadora, baseada em evidências, de 2,1 milhões de casos humanos anuais. Embora a maior parte desse ônus e dos fatores de risco se concentre nas regiões da África e da Ásia, áreas dentro das Américas e da Europa permanecem sob alerta constante (Laine *et al.*, 2023).

A infecção humana por *Brucella* spp. ocorre principalmente por meio da exposição ocupacional via contato com animais infectados ou inalação de aerossóis (Brasil, 2021). Embora vias alternativas sejam descritas, a rota alimentar associada ao consumo de lácteos não pasteurizados apresenta grande relevância para a saúde pública, especialmente em regiões endêmicas onde falhas higiênicas na pecuária e

no manuseio de alimentos amplificam o risco de disseminação (OMS, 2020; Brasil, 2021).

Surtos e infecções humanas têm sido amplamente vinculados à ingestão de leite cru e derivados, a exemplo dos QALC, que atuam como importantes veículos do patógeno. Historicamente, essa associação é evidenciada na Espanha por múltiplos episódios decorrentes do consumo de queijos frescos e artesanais não pasteurizados, englobando desde surtos familiares até eventos epidêmicos com 81 casos registrados (Monsalve *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2003; Colmenero *et al.*, 2011). Além disso, o comércio internacional de produtos informais, como queijos importados do México para os Estados Unidos, e o papel de reservatórios selvagens na Europa, a exemplo do íbex alpino (*Capra ibex*), reforçam a persistência global e a vulnerabilidade da cadeia de laticínios frente a esse microrganismo (Mick *et al.*, 2014; LAC DPH, 2026).

Diante disso, a cadeia de produção de queijos artesanais no Brasil mostra-se vulnerável à contaminação por *Brucella* spp. Vacas infectadas desempenham um papel crítico na manutenção desse risco biológico, uma vez que o microrganismo apresenta tropismo pelo sistema reprodutor e tecido mamário, persistindo em linfonodos supramamários e glândulas mamárias, o que resulta na eliminação contínua ou intermitente da bactéria no leite (Jansen *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2023). Portanto, embora globalmente a maioria dos casos humanos decorra da ingestão de lácteos não pasteurizados de cabras ou ovelhas, a persistência e a eliminação do agente por bovinos acendem o alerta no cenário nacional, dada a centralidade e a magnitude dessa espécie na pecuária leiteira brasileira (OMS, 2020).

As amostras de QALC também foram avaliadas quanto à presença de outros contaminantes. Os resultados indicaram que 29%, 19% e 38% do total avaliado ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação para coliformes totais, coliformes fecais e SCP, respectivamente, corroborando os achados de Firmo *et al.* (2023). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de *Brucella* spp. e a contaminação por SCP ($p = 0,03$), cujo principal representante é *Staphylococcus aureus*, um agente causador frequente de mastite em animais leiteiros. Houve ainda uma proximidade do nível de significância para a associação de *Brucella* spp. com coliformes totais ($p = 0,09$), que são indicadores clássicos de falhas higiênico-sanitárias durante a produção do queijo. Juntos, esses dados evidenciam lacunas na saúde animal, nas práticas de higiene e na segurança microbiológica do produto (Costanzo *et al.*, 2020; Hammad *et al.*, 2022). Esse cenário justifica o fato de

o leite e os produtos lácteos ocuparem a quarta posição entre as principais fontes de surtos de DTHA no Brasil no período de 2014 a 2023 (Brasil, 2024c).

Além disso, a ocorrência de *Brucella* spp. nos queijos variou entre as regiões, apresentando uma relação inversa com o tempo decorrido desde o reconhecimento oficial da região como produtora tradicional. Constatou-se que os queijos provenientes de regiões não reconhecidas, como a R9, ou de reconhecimento recente exibiram proporção de contaminação superior à observada nos queijos oriundos de áreas já consolidadas. Esse padrão sugere o impacto positivo do suporte técnico contínuo oferecido pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER). Acredita-se que a regularidade da assistência técnica promova uma maior adesão às Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Fabricação (BPF) nas agroindústrias familiares, elevando a segurança do produto.

No cenário nacional, a eficácia dessas medidas é bem documentada. No Paraná, Perin *et al.* (2021) observaram reduções significativas nas contagens bacterianas e de células somáticas em uma propriedade familiar após adequações no manejo e higiene de ordenha. Da mesma forma, em Minas Gerais, Melo (2025) constatou que o treinamento dos colaboradores e o ajuste na rotina de ordenha reduziram a Contagem em Placa Padrão (CPP) de 1.489,5 UFC/mL para 255,25 UFC/mL, além de diminuir a Contagem de Células Somáticas (CCS), reforçando a importância da orientação técnica na base produtora.

Esse impacto também é observado na etapa de processamento em pequena escala. Ao avaliarem a capacitação de produtores artesanais de queijo nas BPF, Ramón *et al.* (2018) verificaram que o treinamento direcionado corrigiu as falhas higiênicas iniciais tanto na desinfecção de utensílios quanto nos hábitos dos manipuladores, reduzindo de forma expressiva os níveis de contaminação microbiológica no produto final.

As análises espaciais permitiram identificar dois clusters de alta densidade relacionados à ocorrência de *Brucella* spp. em queijos, sendo um localizado em Minas Gerais e outro no Piauí. A concentração de amostras positivas em uma área do Piauí, estado que não possui territórios produtores oficialmente reconhecidos e submetidos a mecanismos específicos de regulamentação e fiscalização, evidencia a importância de ações institucionais voltadas ao reconhecimento, acompanhamento e organização da produção artesanal como estratégias de prevenção e controle da circulação do agente na cadeia produtiva. Em Minas Gerais, embora a atividade seja tradicional e

conte com territórios produtores consolidados, a identificação de um cluster demonstra que a ocorrência de *Brucella* spp. permanece como um desafio sanitário, reforçando a necessidade de aprimoramento contínuo das BPA e das BPF (Minas Gerais, 2020).

Adicionalmente, a sobreposição espacial entre áreas com registros de casos humanos de brucelose e áreas com ocorrência de *Brucella* spp. nos queijos constitui um importante alerta epidemiológico. Embora essa sobreposição, isoladamente, não permita estabelecer uma relação direta entre a presença do agente nos alimentos e a notificação de casos humanos, o padrão observado suscita a hipótese de que a via alimentar possa contribuir para a transmissão da brucelose na população. Nesse sentido, os achados ressaltam a necessidade de maior atenção à brucelose no âmbito da saúde pública, considerando seu caráter zoonótico e a possibilidade de exposição humana por meio do consumo de produtos lácteos contaminados (Islam *et al.*, 2023).

Diante dos achados, a PCR pode constituir uma ferramenta complementar de triagem para a investigação de *Brucella* spp. em QALC, com potencial para apoiar a tomada de decisão pelos órgãos de fiscalização e direcionar ações de vigilância e controle. Dessa forma, os resultados obtidos podem contribuir para o aprimoramento de políticas públicas voltadas à segurança dos alimentos, à prevenção de zoonoses e à proteção da saúde pública, fortalecendo a integração entre as ações de vigilância sanitária e de saúde animal sob a perspectiva de Uma Só Saúde.

6.2.1 Resultados inconclusivos na detecção molecular de *Brucella* spp.

Em algumas amostras, observou-se a amplificação de um fragmento de 469 pb na primeira etapa da nested PCR, porém sem a subsequente obtenção do fragmento de 363 pb esperado na segunda reação, razão pela qual esses resultados não foram considerados positivos para *Brucella* spp. Não foram identificados, na literatura consultada, relatos de situação semelhante envolvendo esse padrão de amplificação em ensaios de nested PCR para detecção de *Brucella* spp. Esse achado pode estar relacionado a limitações específicas da etapa de amplificação interna. A nested PCR é dependente da utilização do produto da primeira reação como molde para uma segunda amplificação com primers internos e, embora essa estratégia aumente a sensibilidade e a especificidade do ensaio, a eficiência da segunda reação pode ser influenciada pela quantidade e pela qualidade do DNA-alvo disponível (Lorenz, 2012; Bello, 2023; Kombo, 2025).

Em matrizes complexas, a presença residual de compostos inibidores também pode reduzir a eficiência da PCR e contribuir para resultados falso-negativos, mesmo quando houve amplificação na etapa inicial (Schrader *et al.*, 2012). Além disso, variações na sequência da região-alvo podem comprometer o anelamento dos primers internos e, conseqüentemente, impedir a formação do produto esperado, uma vez que incompatibilidades entre primer e molde podem reduzir substancialmente o desempenho da amplificação (Bru *et al.*, 2008). Assim, a ausência do fragmento de 363 pb pode refletir uma limitação técnica ou analítica da segunda etapa da reação, não sendo possível, com base nesse resultado isolado, confirmar a presença de *Brucella* spp. nas amostras.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização do protocolo de extração de DNA baseado em tiocianato de guanidina mostrou-se adequada para a obtenção de material genético a partir dos QALC e possibilitou a realização das análises moleculares subsequentes. A recuperação de DNA com integridade estrutural satisfatória reforça a eficiência do procedimento diante das limitações inerentes à extração de material genético a partir de matrizes lácteas complexas. A aplicação desse protocolo, associada à nested PCR direcionada ao gene *eryD*, permitiu a investigação da ocorrência de *Brucella* spp. nas amostras avaliadas.

A detecção de *Brucella* spp. ocorreu em 10,8% das amostras, distribuídas em quatro regiões produtoras (Serro, Araxá, Canastra e Piauí). Esse resultado apresentou relação inversa com o tempo decorrido desde o reconhecimento oficial das regiões como produtoras tradicionais, com maiores proporções de positividade em regiões não reconhecidas ou de reconhecimento mais recente. Esse achado pode refletir lacunas ainda existentes na adoção de medidas de saúde animal, higiene e segurança microbiológica ao longo da cadeia produtiva. Além disso, foi identificada associação significativa entre a presença de *Brucella* spp. e as contagens de SCP ($p = 0,03$), sendo observada maior frequência de positividade entre as amostras com contagens mais elevadas desse grupo microbiano. Embora não significativa, também foi observada tendência de maior positividade nas amostras com contagens elevadas de coliformes totais ($p = 0,09$). Em conjunto, esses achados reforçam a importância do aprimoramento contínuo das práticas sanitárias na produção de QALC, especialmente por meio da assistência técnica regular, que pode favorecer a adoção das BPA e de BPF e, conseqüentemente, contribuir para a segurança dos produtos. As análises espaciais complementaram esses achados ao evidenciarem a formação de clusters de alta densidade de amostras positivas em Minas Gerais e no Piauí, contribuindo para a identificação de áreas que podem demandar maior atenção das autoridades sanitárias.

Nesse contexto, a educação sanitária destaca-se como estratégia complementar às ações de vigilância e controle da brucelose na produção de queijos artesanais. Ações educativas contínuas, voltadas à sensibilização dos produtores e à percepção dos riscos associados à presença de *Brucella* spp., podem favorecer a adoção de medidas de prevenção e controle, incluindo o manejo sanitário dos

rebanhos, a vacinação, o correto destino de materiais provenientes de abortamentos e partos, o uso de equipamentos de proteção individual e o cumprimento das BPA e das BPF. Dessa forma, esta pesquisa pode subsidiar ações integradas de educação sanitária, vigilância e prevenção, contribuindo para a melhoria da qualidade e segurança dos QALC e para o fortalecimento de estratégias fundamentadas no conceito de Uma Só Saúde, que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental.

8 FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; auxílios SEG 02.13.10.007.00.00 e SEG 12.13.10.007.00.00), CAPES (bolsa de mestrado), pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; auxílios APQ-02746-14, APQ-03989-17, APQ-04335-17, APQ-01503-22 e PPM-00526-16), pela FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; auxílio E26/202.575/2019) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; auxílio 421748/2022-2).

REFERÊNCIAS

- ALBERT, V.; RAMAMURTHY, T.; DAS, S.; DOLMA, K. G.; MAJUMDAR, T.; BARUAH, P. J.; HAZARIKA, S. C.; APUM, B.; DAS, M. Comprehending the risk of foodborne and waterborne disease outbreaks: Current situation and control measures with Special reference to the Indian Scenario. **Heliyon**, v. 10, n. 16, p. e36344, 2024. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024123754?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=8fec748f58cbf235. Acesso em: 06 jan. 2025.
- ALTUN, S. K.; YİĞİN, A.; GÜRBİLEK, S. E.; GÜRBÜZ, S.; DEMIRCI, M.; KESKIN, O.; TEL, O. Y. An enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella* specific antibody and real-time PCR for detecting *Brucella* spp. in milk and cheese in Şanlıurfa, Turkey. **Pak Vet J**, v. 37, n. 1, p. 39-42, 2016. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/96847854/39-42-libre.pdf?1672908608=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAn+Enzyme+Linked+Immunosorbent+Assay+for+.pdf&Expires=1783979090&Signature=fALwHV66wL6GHxAUMyb~MxNnwsIj1I5dLKeG3gPHhFbpcv-Q6WzOKbnvaNgg6pvW4Dgl4Q8CxulYCaQnQX4RXNjv7LVNZYakmguOA03GTP6ThY1-lUgONvnN6ilaVbrG-ftmzPxHXnsTnKbZCS8tDPyQUiFYFZRU6a63OOco3EDcdPIIdShIK9zVUo30CcHXA pHT58BOLDxpBaz8K6Cu1gTuNAzxrkB5S7ssTIHWZRBvVfh9dQgScixpGH~1TQIPZGZ7QoP287XI7Vmlbgr2gSZudpvomUVXR0PUz~M3nkKg-G2gRwwlrM31F3gUHR7nruxmhkxzFRm-c2HMEyjCkQ_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 06 jul. 2026.
- ARAUJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; NETO, A. G. V.; MATTOS, A. L. A.; PESSOA, P. F. A. P. Adoção de tecnologia para melhoria do processo de produção de queijo de Coalho artesanal de agricultores familiares dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. In: XXXI Encontro Nacional De Engenharia De Produção, 2011. **Anais...**, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Pedro-Paula-Pessoa/publication/268207819_ADOCAO_DE_TECNOLOGIA_PARA_MELHORIA_DO_PROCESSO_DE_PRODUCAO_DE_QUEIJO_DE_COALHO_ARTESANAL_DE_AGRICULTORES_FAMILIARES_DOS_ESTADOS_DO_CEARA_PIAUI_E_RIO_G_RANDE_DO_NORTE/links/5463aacd0cf2c0c6aec4f681/ADOCADO-DE-TECNOLOGIA-PARA-MELHORIA-DO-PROCESSO-DE-PRODUCAO-DE-QUEIJO-DE-COALHO-ARTESANAL-DE-AGRICULTORES-FAMILIARES-DOS-ESTADOS-DO-CEARA-PIAUI-E-RIO-GRANDE-DO-NORTE.pdf. Acesso em: 05 mai. 2026.
- BARBIER, T.; MACHELART, A.; ZÚÑIGA-RIPA, A.; PLOVIER, H.; HOUGARDY, C.; LOBET, E.; WILLEMART, K.; MURAILLE, E.; BOLLE, X.; SCHAFTINGEN, E. V.; MORIYÓN, I.; LETESSON, J. Erythritol availability in bovine, murine and human models highlights a potential role for the host aldose reductase during *Brucella* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1088, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01088/full>. Acesso em: 23 set. 2026.
- BASTOS, L. S.; CONSONI, F. L.; MESQUITA, F. C. Crescimento e sofisticação produtiva do Queijo Minas Artesanal da Canastra: uma leitura a partir dos processos

inovativos em recursos naturais. **Sociedade & Natureza**, v. 36, p. e69754, 2024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sn/a/FjZqdnSQvnRNnfgkGg74Z9j/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 05 mai. 2026.

BÉJAOU, A.; BEN ABDALLAH, I.; MAAROUFI, A. *Brucella* spp. contamination in artisanal unpasteurized dairy products: An emerging foodborne threat in Tunisia. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2269, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9367864/>. Acesso em: 11 mai. 2026.

BELLO, K. The Principles and New Approaches in Nested Polymerase Chain Reactions. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 14, n. 2, 2023. Disponível em: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/the-principles-and-new-approaches-in-nested-polymerase-chain-reactions.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2026.

BENCHCHEM. **Application Notes and Protocols: Utilizing EDTA for Enzyme Inhibition Studies**. 2026. Disponível em: [https://pdf.benchchem.com/1671/Application Notes and Protocols Utilizing EDTA for Enzyme Inhibition Studies.pdf#:~:text=By%20chelating%20the%20available%20Mg%2B%2C%20EDTA%20reduces%20the,to%20an%20apparent%20inhibition%20of%20the%20enzyme%27s%20activity.%5B%5D](https://pdf.benchchem.com/1671/Application%20Notes%20and%20Protocols%20Utilizing%20EDTA%20for%20Enzyme%20Inhibition%20Studies.pdf#:~:text=By%20chelating%20the%20available%20Mg%2B%2C%20EDTA%20reduces%20the,to%20an%20apparent%20inhibition%20of%20the%20enzyme%27s%20activity.%5B%5D). Acesso em: 13 abr. 2026.

BENCHCHEM. **Guanidine thiocyanate method for DNA extraction from complex samples: application notes and protocols**. 2025. Disponível em: [https://pdf.benchchem.com/14/Guanidine Thiocyanate Method for DNA Extraction from Complex Samples Application Notes and Protocols.pdf](https://pdf.benchchem.com/14/Guanidine%20Thiocyanate%20Method%20for%20DNA%20Extraction%20from%20Complex%20Samples%20Application%20Notes%20and%20Protocols.pdf). Acesso em: 20 mar. 2026.

BENINCÁ, T.; SANT'ANNA, V.; BERRETA, M. S. R.; FORTUNEL, F. Queijo de leite cru: estudos de caso com agroindústrias e vigilância sanitária no Departamento de Sarthe, França. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 168-177, 2020. Disponível em: <https://hal.science/hal-03230073/>. Acesso em: 11 mai. 2026.

BENINCÁ, T.; SANTOS, V. Z.; SANT'ANNA, V.; BERRETA, M. S. R. Correlação entre dados microbiológicos e físico-químicos com as boas práticas de fabricação de queijos coloniais produzidos no Sul do Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 39, n. 3, p. e27176-e27176, 2022. Disponível em: <https://apct.sede.embrapa.br/cct/article/view/27176/15127>. Acesso em: 11 mai. 2026.

BENITEZ-VELÁSQUEZ, M.; CABRERA, R.; RÍOS-TOBÓN, S.; ISAZA, J. P.; GUTIÉRREZ, L. A. Assessment of four different DNA extraction methodologies for the molecular detection of phage λ and *Bacillus* sp. in raw bovine milk samples. **International Dairy Journal**, v. 151, p. 105862, 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694623002819>. Acesso em: 19 mar. 2026.

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 artisan cheese commercialized in

Parnaíba, Piauí state, Brazil. **Medicina Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 33-37, 2019.

Disponível em:

https://www.academia.edu/82050494/Detection_of_Brucella_spp_in_artisan_cheese_commercialized_in_Parna%C3%ADba_Piau%C3%AD_state_Brazil. Acesso em: 06 jul. 2026.

BOURDETTE, M. D. S.; SANO, E. E. Características Epidemiológicas da Brucelose Humana no Brasil no período 2014-2018. **Revista Cereus**, v. 15, n. 2, p. 27-40, 2023. Disponível em:

<https://www.ojs.unirg.edu.br/index.php/1/article/view/4104/2058>. Acesso em: 18 mai. 2026.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos em anexo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/legislacao/Port1461996RTqueijomanteigacremedeleitegorduralctealeitefluido.pdf>. Acesso em: 23 set. 2026.

BRASIL. Instrução Normativa MAPA nº 30, de 7 de agosto de 2013. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 ago. 2013. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/legislacao/IN302013RTqueijoartesanai.pdf>. Acesso em: 23 set. 2026.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Secretaria-Geral**, Brasília, DF, 19 jul. 2019. Disponível em:

https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Lei/L13860.htm. Acesso em: 05 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar**. Manual de Treinamento. Brasília, DF, 2021.

Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/manual_dtha_2021_web.pdf. Acesso em: 18 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 724, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jul. 2022a. Disponível em:

https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=RDC&numeroAto=00000724&seqAto=002&valorAno=2022&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_menu=9434&cod_modulo=310&pesquisa=true. Acesso em: 12 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**,

Brasília, DF, 06 jul. 2022b. Disponível em:

https://anvisa.gov.br/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=INM&numeroAto=00000161&seqAto=000&valorAno=2022&orgao=ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_menu=9434&cod_modulo=310&pesquisa=true. Acesso em: 12 jan. 2025.

BRASIL. Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Secretaria-Geral**, Brasília, DF, 22 jun. 2022c. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2022/Decreto/D11099.htm. Acesso em: 05 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Brucelose e Tuberculose**. 30 jul. 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/brucelose-e-tuberculose/brucelose-ovina>. Acesso em: 18 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Cultura. **Modos de fazer o Queijo Minas Artesanal são reconhecidos como Patrimônio Cultural da Humanidade**. Brasília, DF, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/iphan/pt-br/assuntos/noticias/modos-de-fazer-o-queijo-minas-artesanal-sao-reconhecidos-patrimonio-cultural-da-humanidade>. Acesso em: 04 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe – 2024**. 2024c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/situacao-epidemiologica/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024.pdf>. Acesso em: 06 jul. 2026.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Pesquisa analisa características únicas do queijo artesanal do Serro**. Brasília, DF, 18 nov. 2025a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/2022/ciencia-mostra-como-se-forma-o-terroir-do-queijo-minas-artesanal-do-serro>. Acesso em: 05 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Brucelose Humana**. Brasília, DF, 16 set. 2025b. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/resumos/pcdt-resumido-da-brucelose-humana>. Acesso em: 22 set. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Brucelose Humana**. Brasília, DF, [s.d.]a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/b/brucelose-humana>. Acesso em: 18 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. [s.d.]b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 06 jan. 2025.

BRU, D.; MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA

gene as an example. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1660-1663, 2008. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.02403-07>. Acesso em: 22 jul. 2026.

BUSTIN, S. A.; RUIJTER, J. M.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; TRAN, N.; RÖDIGER, S.; UNTERGASSER, A.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; MILAVEC, M.; BURNS, M. J.; HUGGETT, J. F.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. **Clinical Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 634-651, 2025. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/71/6/634/8119148>. Acesso em: 13 abr. 2026.

CALLON, C.; DUTHOIT, F.; DELBÈS, C.; FERRAND, M.; FRILEUX, Y. L.; CRÉMOUX, R. D.; MONTEL, M. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 547-560, 2007. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/17604934>. Acesso em: 12 mai. 2025.

CANCELLARE, I.; HACKER, C.; JANECKA, J.; WECKWORTH, B. Review of DNA extraction methodologies and guidelines for protocol development. **Panthera; Global Snow Leopard & Ecosystem Protection Program (GSLEP)**, 2021. Disponível em: https://globalsnowleopard.org/wp-content/uploads/2021/07/Review-of-DNA-Extraction-Methodologies-and-Guidelines-for-Protocol-Development_Final.pdf. Acesso em: 19 mar. 2026.

CARDOSO, T. S.; SANTOS, T. J. O.; SARAIVA, L. S.; SILVA, L. C. G.; MARTINS, I. P.; PEREIRA, S.; MENEGALI, I.; TEODORO, V. A. M.; SOBRAL, D.; PINTO, M. S. Produção de queijo artesanal em Minas Gerais: novas e antigas regiões produtoras. In: VII Congresso Internacional de Saúde Única e III Simpósio Internacional Pluriprofissional de Saúde, 2023. **Anais...**, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/server/api/core/bitstreams/e26a269f-d958-4178-a8b1-db77cb63b481/content>. Acesso em: 05 mai. 2026.

CARVALHO, T. P.; SILVA, L. A.; CASTANHEIRA, T. L. L.; SOUZA, T. D.; PAIXÃO, T. A.; LAZARO-ANTON, L.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Cell and Tissue Tropism of *Brucella* spp. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 5, p. e00062-23, 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/iai.00062-23>. Acesso em: 06 jul. 2026.

CHAVES, A. C. S. D.; STEHLING, C. A. V.; SOUZA, G.; SANTOS, L. C. R.; GOMES, P. B.; CASTRO, R. A. B.; MONTEIRO, R. P.; FERREIRA, V. R. **Guia de Negócio: Queijos artesanais brasileiros**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1135036/1/Guia-de-Negocio-Queijos-Artesanais.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2026.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region To Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5113-5121, 2001. Disponível

em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.67.11.5113-5121.2001>. Acesso em: 12 mai. 2025.

COLMENERO, J. D.; CLAVIJO, E.; MORATA, P.; BRAVO, M. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Quantitative real-time polymerase chain reaction improves conventional microbiological diagnosis in an outbreak of brucellosis due to ingestion of unpasteurized goat cheese. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 3, p. 294-296, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889311002562>. Acesso em: 06 jul. 2026.

COSTANZO, N.; CENITI, C.; SANTORO, A.; CLAUSI, M. T.; CASALINUOVO, F. Foodborne pathogen assessment in raw milk cheeses. **International Journal of Food Science**, v. 2020, n. 1, p. 3616713, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2020/3616713?msocid=3bae0f72a64d600d15571d01a783614b>. Acesso em: 11 mai. 2026.

CURRIER, R. W. **Brucellosis history summary**. [s.l.]: United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), [s.d.]. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/Brucellosis%20History%20Abstract_Currier.pdf. Acesso em: 18 mai. 2026.

DADAR, M.; SHAHALI, Y.; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. **International journal of food microbiology**, v. 292, p. 39-47, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160518309267>. Acesso em: 06 abr. 2026.

DELBÈS, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL, M. Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1882 – 1891, 2007. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.01716-06>. Acesso em: 12 mai. 2025.

DUCH, A. A. S.; CONCEIÇÃO, V. B.; FERNANDES, J.; FORNEAS, D. S.; FREITAS, D. E. S.; FRANK, H. O.; OLIVEIRA, J. G.; CASTRO, K. N. C.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; MEURER, I. R.; CORRÊA, J. O. A.; RIBEIRO, J. B.; MENEZES, L. D. M.; ALMEIDA, P. A. A.; ROZENTAL, T.; SILVA, M. R.; LEMOS, E. R. S. *Coxiella burnetii* in Minas and Coalho raw milk artisanal cheese and possible spatial associations with human exposure in Brazil: a cross-sectional study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 442, p. 111386, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160525003319>. Acesso em: 11 mai. 2026.

DUTHOIT, F.; GODON, J.; MONTEL, M. Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3840-3848, 2003. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.69.7.3840-3848.2003>. Acesso em: 12 mai. 2025.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Queijo Minas Artesanal: Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro**. 2023. Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/download.do?id=87229>. Acesso em: 05 mai. 2026.

EURL - European Union Reference Laboratory for Brucellosis. **Brucella culture and genus identification: Standard Operating Procedure**. Revision 05. 2021a. Disponível em: <https://sitesv2.anses.fr/sites/default/files/EU%20Brucellosis%20culture%20and%20identification%20SOP%202021%20v5.pdf>. Acesso em: 06 abr. 2026.

EURL - European Union Reference Laboratory for Brucellosis. **Brucellosis - Milk Ring-Test: Standard Operating Procedure**. Revision 0. 2021b. Disponível em: https://sitesv2.anses.fr/sites/default/files/SOP%20Brucellosis%20EU-RL%20MRT_Rev0_2021.pdf. Acesso em: 06 abr. 2026.

FDA - Food and Drug Administration. **The Dangers of Raw Milk: Unpasteurized Milk Can Pose a Serious Health Risk**. 2024. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/dangers-raw-milk-unpasteurized-milk-can-pose-serious-health-risk>. Acesso em: 23 set. 2026.

FICHT, T. *Brucella* taxonomy and evolution. **Future Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 859-866, 2010. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2923638/>. Acesso em: 18 mai. 2026.

FIRMO, M. J. N.; MENEZES, L. D. M.; SALES, G. A.; CARVALHO, A. F.; COSTA, N. M. E. P. L.; JÚNIOR, B. R. C. L.; MARTINS, M. L. Diagnosis of the microbiological quality of fiscal artisanal Minas cheese samples. **Food Control**, v. 153, p. 109887, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713523002876>. Acesso em: 06 jul. 2026.

FONSECA, S. H.; SOUZA, M. R.; SOUZA, B. M. S.; CORTEZ, M. A. S.; FONSECA, L. M. Fatores relacionados à maturação de queijos artesanais que apresentam efeitos deletérios sobre microrganismos patogênicos: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 4, p. 227-238, 2022. Disponível em: https://revistadoilct.com.br/ilct/pt_BR/article/view/910/597. Acesso em: 23 set. 2026.

GADHARI, A. V.; THORAT, V. D.; GANDGE, R. S.; PHARANDE, R. R.; PAWAR, V. D. EryC PCR assay as DIVA tool for Bovine Brucellosis. **International Journal of Current Science Research and Review**, v. 08, n. 07, p. 3662-3667, 2025. Disponível em: <https://ijcsrr.org/wp-content/uploads/2025/07/53-2107-2025.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2026.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, p. 175-178, 2019. Disponível em:

<https://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/2/pdb.prot095182.full.pdf+html?sid=507804ff-9606-459e-9e13-9bcbfced3ce8>. Acesso em: 13 abr. 2026.

GUPTA, B.; SINGH, R.; GUPTA, V. K.; NAYAK, A.; JADAV, K. K.; GUPTA, V.; GUPTA, R. Milk ring test to screen brucellosis in dairy animals of Jabalpur. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 6, p. 1113-1115, 2022. Disponível em: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue6S/PartN/S-11-6-136-689.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2026.

GUPTA, N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. **Journal of Cytology**, v. 36, n. 2, p. 116-117, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6425773/>. Acesso em: 19 mar. 2026.

HAMMAD, A. M.; ELTAHAN, A.; HASSAN, H. A.; ABBAS, N. H.; HUSSIEN, H.; SHIMAMOTO, T. Loads of coliforms and fecal coliforms and characterization of thermotolerant *Escherichia coli* in fresh raw milk cheese. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 332, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/3/332>. Acesso em: 06 jul. 2026.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Registro dos queijos artesanais de Minas Gerais, nas regiões do Serro, da Serra da Canastra e Salitre/Alto Paranaíba**. Mai. 2008. Disponível em: https://bcr.iphan.gov.br/wp-content/uploads/tainacan-items/65968/67139/Modo-Artesanal-de-Fazer-Queijo-de-Minas-nas-Regioes-do-Serro-e-das-Serras-da-Canastra-e-do-Salitre_de_Parecer-Conselho-Consultivo.pdf. Acesso em: 04 mai. 2026.

ISLAM, S.; ISLAM, A.; RAHMAN, M.; ISLAM, K.; ISLAM, M.; KAMAL, M.; ISLAM, N. Presence of *Brucella* spp. in milk and dairy products: a comprehensive review and its perspectives. **Journal of Food Quality**, v. 2023, p. 1-19, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2023/2932883>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 24276:2006. **Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions**. Geneva, 2006. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:24276:ed-1:v1:en>. Acesso em: 19 mar. 2026.

IZADI, A.; MOSLEMI, E.; TABATABAEI PANAH, A. S.; KHEIRI MANJILI, H. *Brucella* spp. detection in dairy products using nested and hemi nested PCR techniques. **Annals of Biological Research**, v. 5, n. 1, p. 124-131, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Hamidreza-Kheiri-2/publication/277571781_Brucella_spp_detection_in_dairy_products_using_Nested_and_Hemi_Nested_PCR_techniques/links/566604d308ae418a786f3a8f/Brucella-spp-detection-in-dairy-products-using-Nested-and-Hemi-Nested-PCR-techniques.pdf. Acesso em: 13 abr. 2026.

JANSEN, W.; DEMARS, A.; NICAISE, C.; GODFROID, J.; DE BOLLE, X.; REBOUL, A.; AL DAHOUK, S. Shedding of *Brucella melitensis* happens through milk macrophages in the murine model of infection. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p.

9421, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65760-0#citeas>. Acesso em: 06 jul. 2026.

KASE, J. A.; PFEFER, T. L. Nucleic acid sample preparation from dairy products and milk. *In: Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples*. New York, NY: Springer New York, 2016. p. 231-244. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3185-9_16. Acesso em: 13 abr. 2026.

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F.; 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 Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/25341/21367>. Acesso em: 06 jul. 2026.

KOETSIER, G.; CANTOR, E. A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. **New England Biolabs Inc.**, 2025. Disponível em: https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvs_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf. Acesso em: 21 mar. 2026.

KOMBO, J. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Requirements, Types and Application. **Lifeline Health Sciences**, v. 3, n. 1, p. 98-105, 2025. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/389628021_Polymerase_Chain_Reaction_PCR_Principle_Requirements_Types_and_Application. Acesso em: 13 abr. 2026.

LAC DPH - LOS ANGELES COUNTY DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH. **LAC DPH Health Advisory: Cluster of *Brucella melitensis* (Brucellosis) Infections Linked to Raw Dairy Consumption**. Los Angeles, 2026. Disponível em: <https://t.e2ma.net/webview/f8auzz/fbc04565dc309358be42656324469b38>. Acesso em: 06 jul. 2026.

LAINE, C. G.; JOHNSON, V. E.; SCOTT, H. M.; ARENAS-GAMBOA, A. M. Global estimate of human brucellosis incidence. **Emerging infectious diseases**, v. 29, n. 9, p. 1789-1797, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10461652/>. Acesso em: 06 jul. 2026.

LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 63, p. 3998, 2012. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4846334/pdf/jove-63-3998.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2026.

MALIK, T.; FATIMA, U. Detection and Analysis of Pathogenic Bacteria from Raw and Pasteurized Milk. **Open Access Journal of Complementary & Alternative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 275-281, 2021. Disponível em: <https://lupinepublishers.com/complementary-alternative-medicine->

<journal/fulltext/detection-and-analysis-of-pathogenic-bacteria-from-raw-and-pasteurized-milk.ID.000151.php>. Acesso em: 11 mai. 2026.

MARTÍNEZ, C. M.; JIMENEZ, A. P.; CORTÉS-BLANCO, M.; CHAMIZO, E. S.; MOHEDANO, E. M.; PLATA, C.; BAENA, A. V.; NAVARRO, J. F. M. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalusia (Spain), January-March 2002. **Eurosurveillance**, v. 8, n. 7, p. 164-168, 2003. Disponível em: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esm.08.07.00421-en?crawler=true#html_fulltext. Acesso em: 06 jul. 2026.

MELO, A. A. S. **Implantação de Boas Práticas na ordenha e reflexo na qualidade do leite: estudo de caso**. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Campus Bambuí, Bambuí, 2025. Disponível em: <https://repositorio.ifmg.edu.br/server/api/core/bitstreams/50be59b1-fadf-4d75-b9a9-761672d177b0/content>. Acesso em: 06 jul. 2026.

MICK, V.; CARROU, G. L.; CORDE, Y.; GAME, Y.; JAY, M.; GARIN-BASTUJI, B. *Brucella melitensis* in France: persistence in wildlife and probable spillover from Alpine ibex to domestic animals. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e94168, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094168>. Acesso em: 06 jul. 2026.

MINAS GERAIS. Decreto nº 48.024, de 19 de agosto de 2020. Regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Assembleia Legislativa de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG, 19 ago. 2020. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/legislacao-mineira/texto/DEC/48024/2020/>. Acesso em: 30 set. 2026.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 2322, de 19 de agosto de 2024. Dispõe sobre os períodos de maturação do Queijo Minas Artesanal. **Instituto Mineiro de Agropecuária**, Belo Horizonte, MG, 19 ago. 2024a. Disponível em: https://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&task=frontfile.download&catid=1865&id=20236&Itemid=1000000000000. Acesso em: 23 set. 2026.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 2303, de 24 de maio de 2024. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Artesanal. **Instituto Mineiro de Agropecuária**, Belo Horizonte, MG, 24 mai. 2024b. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=459460>. Acesso em: 27 jun. 2026.

MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de Brucella abortus em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-15062007-114720/publico/Simone_Miyashiro.pdf. Acesso em: 13 jan. 2025.

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detecção de DNA de *Brucella abortus* em queijos clandestinos provenientes de São Paulo e Minas Gerais e diferenciação da vacina B19 pela reação da polimerase em cadeia (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 17–22, 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjm/a/MjhFzYDcSz8JtxyMfyhgnmJ/>. Acesso em: 06 jul. 2026.

MONSALVE, J. C.; RULLÁN, J. V.; CALLIZO, E. F. P.; ALCOLEA, A. N. Epidemic outbreak of 81 cases of brucellosis following the consumption of fresh cheese without pasteurization. **Revista Española de Salud Pública**, v. 70, n. 3, p. 303-311, 1996.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9005033/>. Acesso em: 06 jul. 2026.

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**. 2018. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em:

<https://repositorio.ufmg.br/server/api/core/bitstreams/26141f3f-a42f-40be-a23c-058d29b76568/content>. Acesso em: 23 set. 2026.

NASCIMENTO, B. H. M.; COSTA, V. L. S.; ARAUJO, R. L. M. P. Produção de queijo artesanal no município de Parnaíba, PI. In: V Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, 2019. **Anais...**, 2019. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1145602/1/AnaisVJornadaCientificaEmbrapaMeioNorteSet2019Doc285-1.pdf>. Acesso em: 23 set. 2026.

NATIONAL SAFETY INSTITUTE. **Understanding food hazards: types, risks, and real-life examples**. 22 ago. 2025. Disponível em:

<https://nationalsafetyinstitute.com/understanding-food-hazards-types-risks-and-real-life-examples/>. Acesso em: 08 fev. 2026.

OKURA, M. H.; MOACIR, J. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de queijos minas frescal produzidos com leite cru, leite pasteurizado e de queijo temperado em alguns municípios da região do triângulo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 375, p. 33-42, 2010. Disponível em:

<https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/133>. Acesso em: 11 mai. 2026.

OLIVEIRA, J. A. S.; FERREIRA, L. C. Subnotificação de doenças transmitidas por alimentos em Januária-MG. **Uniciências**, v. 25, n. 2, p. 77-79, 2021. Disponível em:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Subnotifica%C3%A7%C3%A3o-de-Doen%C3%A7as-Transmitidas-por-em-Oliveira-Ferreira/003e6be6ac9dedbe53c6811955377cd9ec3a86f1>. Acesso em: 22 set. 2026.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Brucellosis**. 29 jul. 2020. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/brucellosis>. Acesso em: 06 jul. 2026.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Food safety**. 04 out. 2024. Disponível em:

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 06 jan. 2025.

PADUA, R. A.; LEAL, R. Brucelose bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária da FAEF**, v. 43, n. 2, 2024. Disponível em: https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/BRUCELOSE%20BOVINA.pdf. Acesso em: 18 mai. 2026.

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**, v. 82, p. 1-5, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/i/aib/a/rfttH7p6nFbWNSjfPJTbsXF/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 06 abr. 2025.

PERESI, J. T. M.; TEIXEIRA, I. S. C.; ESTÉCIO, T. C. H.; DOMINGUES, M. F.; PRADO, E. B. C.; MORO, D. K.; NASCIMENTO, L.; GUEDES, T. M. Perfil epidemiológico dos surtos alimentares elucidados laboratorialmente nas últimas décadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 83, p. e40557, 2024. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/41218/38604>. Acesso em: 22 set. 2026.

PERIN, R. L.; GOBATO, L.; BUSATTA, H.; RANKRAPE, F.; STARIKOFF, K. BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS EM PROPRIEDADE LEITEIRA DA AGRICULTURA FAMILIAR. **Revista Ciência em Extensão**, v. 17, p. 65-77, 2021. Disponível em: https://ojs.unesp.br/index.php/revista_proex/article/view/3175/pdf. Acesso em: 06 jul. 2026.

PONZONI, E.; MASTROMAURO, F.; GIANÌ, S.; BREVIARIO, D. Traceability of plant diet contents in raw cow milk samples. **Nutrient**, v. 1, n. 2, p. 251-262, 2009. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/1/2/251>. Acesso em: 12 mai. 2025.

POSSA, M. G.; BERNARDI, F.; NETO, A. P.; CATTELAM, J.; JÚNIOR, I. A. N.; TRENKEL, C. K. G.; MOTA, M. F. Epidemiologia e impacto econômico da ocorrência da brucelose em um município do Estado de Santa Catarina. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e12610313208-e12610313208, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13208/11812>. Acesso em: 18 mai. 2026.

PRESSURE BIOSCIENCES INC. **Extraction of DNA from cheese using ProteoSolve-SB and Pressure Cycling Technology (PCT)**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.pressurebiosciences.com/document/extraction-of-dna-from-cheese-02-17-09/>. Acesso em: 20 mar. 2026.

PRINS, T.; BROOHAERTS, W.; BURNS, M.; DEMŠAR, T.; EDELMANN, S.; PAPAJOVA, N.; PETERSEIL, V.; TAVERNIERS, I. Guidance on the selection and use of DNA extraction methods. **Publications Office of the European Union**, Luxembourg, 2024. Disponível em: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20Guidance%20on%20DNA%20extraction.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2026.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from

raw milk and raw milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 96-105, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22452460/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

RAMÓN, A. N.; DE LA VEGA, S. M.; FERRER, E. C.; BRUNERI, A. P. C.; MILLÁN, M. P.; OLIVEIRA, E. G.; BORELLI, M. F.; VILLALVA, F. J.; PAZ, N. F. Training small producers in Good Manufacturing Practices for the development of goat milk cheese. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 134-141, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/3zhFc3QKG9V3Kz7BHVMyBnL/?lang=en>. Acesso em: 06 jul. 2026.

REBOUL, A.; CARLIER, E.; STUBBE, F. X.; BARBIEUX, E.; DEMARS, A.; ONG, P. T. A.; GERODEZ, A.; MURAILLE, E.; DE BOLLE, X. PdeA is required for the rod shape morphology of *Brucella abortus*. **Molecular Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1449-1463, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/mmi.14833>. Acesso em: 18 mai. 2026.

RODRÍGUEZ, M. C.; VIADAS, C.; SEOANE, A.; SANGARI, F. J.; LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-LOBO, J. M. Evaluation of the effects of erythritol on gene expression in *Brucella abortus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50876, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050876>. Acesso em: 13 abr. 2026.

SANGARI, F. J.; GARCÍA-LOBO, J. M.; AGÜERO, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, n. 3, p. 337-342, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/037810979490314X>. Acesso em: 13 abr. 2026.

SANTANA, L. A.; NOVELLI, M. M.; VIDAL, A. L. A.; PEREIRA, S. O.; GASPARINNI, L. P.; ALVARENGA, A. P. F.; MOTTA, O. J. R. Brucelose: atualização para a prática clínica. **Saúde Dinâmica**, v. 2, n. 3, p. 75-89, 2020. Disponível em: <https://revista.faculadedinamica.com.br/index.php/sausedinamica/article/view/43/169>. Acesso em: 18 mai. 2026.

SCHARFF, J. V. T.; MENEGUELLI, M. Impactos da brucelose na reprodução de bovinos leiteiros. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 10, p. e113131047174-e113131047174, 2024. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/47174/37295>. Acesso em: 18 mai. 2026.

SCHMITT, C. I.; KRUG, F. D. M.; CERESER, N. D.; PINTO, F. R. Brucelose: uma questão de saúde pública. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 9, p. 1-17, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009007.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2026.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012. Disponível em: <https://enviromicro->

journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. Acesso em: 13 abr. 2026.

SERRANO, N. S.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; STEPHAN, R. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 2, p. 7337, 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6036992/>. Acesso em: 11 mai. 2026.

SHELEIDRES, C. G. Relevância sociocultural e econômica da produção de queijos artesanais no Brasil: importância e histórico. **Revista Científica Semana Acadêmica**, v. 13, p. 2-15, 2025. Disponível em: https://semanaacademica.org.br/system/files/artigos/artigo_revisao_sheleidres_camila_gomes_0_0.pdf. Acesso em: 04 mai. 2026.

SHEN, C. H. Amplification of Nucleic Acids. In: SHEN, C. H. **Diagnostic Molecular Biology**. Academic Press, 2019. New York: Elsevier, 2019. p. 215-247. Acesso em: 13 abr. 2026.

SIDSTEDT, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. **Anal Bioanal Chem**, v. 412, n. 9, p. 2009-2023, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7072044/>. Acesso em: 30 mar. 2026.

SILVA, J.; MORAES, C. M.; SILVA, C. L.; SALES, G. A.; KEID, L. B.; MATOS, P. C. M.; LARA, A. P. S. S.; MORAES, C. C. G. *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. 08, p. 705-710, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/tkQv5rTzVDCtMkTgn5HvnPG/>. Acesso em: 06 jul. 2026.

SILVA, M. R.; DUCH, A. A. S.; LAGE, R. T. P. A.; FARIA, L. S.; MENEZES, L. D. M.; RIBEIRO, J. B.; SOUZA, G. N.; FILHO, P. M. S.; PREIS, I. S.; SALES, E. B.; SOUZA, P. G.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA E GUIMARÃES, R. J. P.; MENDES, T.; PETTAN-BREWER, C.; FONSECA-JÚNIOR, A. A. 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. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/116/11/1091/6687838?login=false>. Acesso em: 06 jul. 2026.

SILVA, M. R.; DUCH, A. A. S.; LAGE, R. T. P. A.; MENEZES, L. D.; RIBEIRO, J. B.; SOUZA, G. N.; FILHO, P. S.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; FARIA, L. S.; COSTA, R. R. Occurrence of *Brucella* in Minas artisanal cheese of Serro micro-region: an important public health problem. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, p. 79-84, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330373958_Occurrence_of_Brucella_in_Minas_artisanal_cheese_of_Serro_micro-region_an_important_public_health_problem. Acesso em: 11 mai. 2026.

SILVA, M. R.; ROCHA, A. S.; COSTA, R. R.; ALENCAR, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; SALES, M. L.; ISSA, M. A.; FILHO, P. M. S.; PEREIRA, O. T. V.; SANTOS, E. C.; MENDES, R. S.; FERREIRA, A. M. J.; MOTA, P. M. P. C.; SUFFYS, P. N.; GUIMARÃES, M. D. C. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 321-327, 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4005580/>. Acesso em: 11 mai. 2026.

SILVA, M. R.; SOUZA, G. N.; FRANK, H. O.; LEMOS, E. R. S.; CANTELL, C. P.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; FARIA, L. S.; CONCEIÇÃO, V. B.; CASTRO, F. F. A.; FILHO, P. M. S.; SOUZA, P. G.; RIBEIRO, J. B.; CASTRO, K. N. C.; ARAÚJO, F. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; JESUS, J. F.; HÚNGARO, H. M.; GONÇALVES, A. G.; BOHNENBERGER, S. G. A.; PAULINO, T. O.; FONSECA-JÚNIOR, A. A.; PETTAN-BREWER, C. Possíveis riscos microbiológicos do consumo de queijos artesanais feitos de leite cru. In: COSTA, F. F.; HÚNGARO, H. M.; SILVA, J. P. S. S.; RODARTE, M. P.; SILVA, P. H. D. (org.). **Gestão, qualidade e inovações tecnológicas: produções acadêmicas em ciência e tecnologia do leite e derivados**. Juiz de Fora: Editar, 2024. p. 185-203. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1169247>. Acesso em: 15 mai. 2026.

SOLERA, J. S.; CASTAÑO, M. J. Brucellosis. In: CASTAÑO, M. J.; NAVARRO, E.; SOLERA, J. S. **International Encyclopedia of Public Health**. Elsevir, 2008. p. 357-369. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/referencework/abs/pii/B9780123739605005608?via%3Dihub>. Acesso em: 18 mai. 2026.

STARIKOFF, K. R.; FONTANESI, C. D.; MACIEL, F. M.; IKUTA, C. Y.; FERREIRA, F.; NETO, J. S. F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, P. H. F.; PAULA, J. C. J.; TELLES, E. O. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3743-3758, 2016. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445748364032.pdf>. Acesso em: 23 set. 2026.

TABIBNEJAD, M.; ALIKHANI, M. Y.; ARJOMANDZADEGAN, M.; HASHEMI, S. H.; NASERI, Z. The optimization of molecular detection of clinical isolates of *Brucella* in blood cultures by eryD transcriptase gene for confirmation of culture-negative samples. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 4, p. e23879, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4912833/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

TEODORO, V. A. M.; SOBRAL, D.; PAULA, A. C.; PAULA, J. C. J.; COSTA, R. G. B.; MACHADO, G. M. M. Estudo de caso sobre as contagens de bactérias ácido-láticas do pingo de uma queijaria produtora de queijo Minas artesanal. In: 35º Congresso Nacional de Laticínios, 2022. **Anais...**, 2022. Disponível em: <https://www.livrariaepamiq.com.br/wp->

[content/uploads/2023/02/anais_35_CNL_minas_lactea_2022.pdf](#). Acesso em: 22 set. 2026.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **NanoDrop Spectrophotometers: Nucleic acid measurements**. 2024. Disponível em: <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf#:~:text=This%20booklet%20provides%20nucleic%20acid%20measurement%20support%20information,more%20detailed%20instrument%20and%20software%20feature-related%20information%20>. Acesso em: 22 mar. 2026.

TORRICO, C. E. R. **BRUCELOSIS EN EL GANADO**. Blog Total Pec, 2023. Disponível em: <https://totalpec.com/blog/174/brucelosis-en-el-ganado>. Acesso em: 24 mai. 2026.

WANG, H.; QI, J.; XIAO, D.; WANG, Z.; TIAN, K. A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 106, p. 109-118, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071716307763>. Acesso em: 30 mar. 2026.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997508001412>. Acesso em: 23 set. 2026.

ZHANG, C.; FOWLER, M. R.; SCOTT, N. W.; LAWSON, G.; SLATER, A. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1149–1158, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713506002106?via%3Di> [hub](#). Acesso em: 12 mai. 2025.

APÊNDICE A – Parâmetros de concentração e pureza das amostras avaliados por espectrofotometria (NanoDrop™)

Amostra	[] ng/μL	A260/A280
94	176,60	2,01
95	110,30	1,98
96	252,60	1,66
97	287,85	1,82
98	312,19	1,80
99	465,99	1,88
100	566,09	1,92
101	196,54	1,73
102	1035,20	1,61
103	2071,41	1,62
106	170,10	1,77
107	84,64	1,55
110	528,90	1,71
123	302,13	1,57
124	153,56	2,12
125	16,20	2,08
126	212,03	1,67
127	51,68	1,90
128	42,87	1,50
149	199,74	1,72
152	108,06	1,64
155	217,60	1,59
156	291,53	1,69
193	473,09	1,22
194	374,50	1,47
195	339,05	1,59
196	292,00	1,45
197	124,47	1,47
198	381,00	1,64
199	42,50	1,20
204	99,17	1,57
206	29,30	1,84
207	159,65	1,40
223	79,19	1,50
231	234,55	1,63
232	184,85	1,47
233	982,35	1,23
234	261,55	1,86
235	128,04	1,41
236	173,03	1,39
237	296,10	1,56
244	192,09	1,63
245	308,70	1,71
246	152,22	1,50
272	39,98	1,31
278	297,91	1,65
279	207,68	1,83
280	187,83	1,77
281	153,59	1,64
282	45,45	1,93
283	182,22	1,63
284	86,3	1,87
285	239,11	2,01

Amostra	[] ng/μL	A260/A280
286	82,45	1,80
287	189,28	1,77
1245	420,87	1,78
1247	296,20	1,63
1248	512,58	1,50
1249	220,30	1,67
1250	270,44	1,75
1251	140,90	1,43
1252	107,99	1,49
1253	404,25	1,64
1254	216,23	1,78
1287	5,55	3,98
1288	303,91	1,53
1289	439,29	1,60
1290	258,55	1,49
1291	26,20	1,85
1292	535,66	1,43
1293	230,92	1,82
1323	343,49	1,49
1324	225,14	1,34
1325	355,08	1,57
1326	291,45	1,49
1327	434,43	1,64
1328	10,13	2,49
1329	557,03	1,55
1330	458,95	1,71
1331	330,61	1,76
P1	63,16	1,88
P2	61,10	1,72
P3	77,47	1,65
P4	42,26	1,76
P5	43,02	1,53
P6	226,23	1,54
P7	76,51	1,86
P9	117,65	1,49
P10	742,14	1,73
P11	84,12	1,58
P12	26,42	1,77
P13	423,76	1,51
P14	31,24	1,83
P15	448,97	1,60
P16	342,77	1,53
P17	120,91	1,46
P18	22,32	1,94
P19	57,52	1,69
P20	99,12	1,76
FIO138	226,33	1,35
FIO139	683,85	1,64
FIO140	188,97	1,04
FIO141	438,54	1,28
FIO142	368,37	1,25
FIO181	194,46	1,53
FIO182	52,11	1,62
FIO183	124,17	1,29
FIO184	138,79	1,23
FIO222	291,57	1,50
FIO223	120,38	1,40

Amostra	[] ng/μL	A260/A280
FIO232	291,84	1,52
FIO233	242,29	1,36
FIO269	57,78	1,09
FIO270	42,21	1,27
FIO271	305,43	1,83
FIO272	92,05	1,47
FIO273	363,20	1,71
FIO274	95,03	1,23
FIO275	239,82	1,47
FIO286	370,43	1,11
FIO352	222,32	1,55
FIO356	190,13	1,22
FIO384	85,00	1,66
FIO385	191,95	1,89
FIO386	49,99	1,66
FIO387	1009,53	1,64
FIO388	340,72	1,25
FIO390	395,12	1,14
FIO391	516,96	1,35
FIO393	275,50	1,03
FIO429	49,76	1,35
FIO452	239,06	1,83
FIO453	300,08	1,67
FIO470	277,59	1,85
FIO471	262,99	1,59
FIO472	316,31	1,44
FIO473	88,21	1,60
FIO515	284,83	1,21
FIO524	307,08	1,54
FIO525	55,80	1,33
FIO526	6,69	1,78
FIO527	52,73	1,70
FIO528	150,72	1,62
FIO529	340,12	1,32
FIO596	252,60	1,25
FIO597	286,58	1,12
FIO598	342,90	1,16
FIO599	314,67	1,53
FIO600	281,10	1,84
FIO621	247,36	1,49
FIO652	427,00	1,61
FIO653	746,33	1,37
FIO654	154,59	1,05
FIO655	163,45	1,03
FIO656	159,58	1,00
FIO657	379,23	1,48
FIO721	277,25	1,95
FIO722	454,34	1,66
FIO733	441,98	1,33
FIO758	515,72	1,36
FIO759	116,73	1,11
FIO760	218,97	1,64

Amostra	[] ng/μL	A260/A280
FIO761	248,81	1,72
FIO762	196,73	1,32
FIO763	230,72	1,36
FIO764	545,21	1,38
FIO767	355,53	1,55
ZOO01	122,88	1,70
ZOO02	214,07	1,66
ZOO03	364,03	1,38
ZOO04	110,50	1,78
ZOO05	490,19	1,57
ZOO06	561,12	1,31
ZOO07	573,89	1,76
ZOO08	1358,40	1,50
ZOO09	217,38	2,21
ZOO10	500,52	1,80
ZOO11	241,70	1,95
ZOO12	137,24	2,11
ZOO13	402,26	2,03
ZOO14	500,37	1,81
ZOO15	267,29	2,11
ZOO16	383,48	1,73
ZOO17	238,76	2,08
ZOO18	252,44	1,73
ZOO19	233,74	1,73
ZOO20	388,88	2,06
ZOO21	527,43	1,91
ZOO22	254,24	1,47
ZOO23	363,68	1,55
ZOO24	501,51	1,81
ZOO25	1051,32	1,73
ZOO26	497,28	1,94
ZOO27	250,40	1,80
ZOO28	556,25	1,74
ZOO29	809,31	1,88
ZOO30	886,23	1,94
ZOO31	263,04	1,86
ZOO32	1136,09	1,02
ZOO33	29,48	1,91
ZOO35	426,56	1,75
ZOO36	357,40	1,87
ZOO37	527,60	1,86
ZOO38	989,45	1,94
ZOO39	1334,96	1,91
ZOO40	293,43	1,79
ZOO41	351,53	1,65
ZOO42	231,89	1,83
ZOO43	348,94	2,02
ZOO44	1267,72	1,14
ZOO45	147,79	1,71
ZOO46	429,42	1,74
ZOO47	1659,95	1,10
ZOO48	155,48	1,91
ZOO49	494,76	1,61
ZOO50	280,99	1,79
ZOO51	182,42	1,75
ZOO52	390,61	1,77
ZOO53	235,11	1,88

Amostra	[] ng/ μ L	A260/A280
ZOO54	357,70	1,76
ZOO55	124,73	1,89
ZOO56	959,65	1,40