

CAPÍTULO 4

VIGILÂNCIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA DETECTAR *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM LEITE CRU E QUEIJS ARTESANAIS DE AGROINDÚSTRIAS NO SEMIÁRIDO DO BRASIL

Data de aceite: 01/08/2024

Pirajá Saraiva Bezerra Neto

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil

Giovanni Brito Medeiros

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil

Denize Monteiro dos Anjos

Programa de Pós-Graduação em Geografia (PPGG), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brasil

Maria Luana Cristiny Rodrigues

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil

Sérgio Santos de Azevedo

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil

Daiane Aparecida Rosa Lima

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brasil

Flávio Ribeiro de Araújo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Campo Grande, MS, Brasil

Clebert José Alves

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal (PPGCSA), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil

RESUMO: A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a tuberculose uma doença reemergente e uma grande ameaça devido ao aumento do número de notificações em humanos, particularmente em pessoas vivendo com HIV/AIDS. O leite cru pode abrigar vários patógenos incluindo o *Mycobacterium bovis*, causador da tuberculose em bovinos, bem como em humanos. No estado do Rio Grande do Norte (RN), a cadeia produtiva de leite e derivados constitui uma atividade econômica e social de elevada importância, contribuindo para a geração de emprego e renda. Objetivou-se com este estudo, realizar vigilância molecular, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), analisar a presença do *M. bovis* em 36 amostras, sendo 18 de

leite cru e 18 de queijo de coalho artesanal, provenientes de agroindústrias no Estado. A PCR não detectou DNA do agente nas amostras coletadas. Este trabalho é de particular relevância para o RN, pois o Estado nunca realizou inquérito epidemiológica para determinar a prevalência da tuberculose em bovinos. É importante que a população seja alertada sobre os riscos associados ao consumo de leite e derivados lácteos não pasteurizados.

PALAVRAS-CHAVE: leite cru; queijo de coalho; *Mycobacterium bovis*; alimento seguro; Saúde Única.

ABSTRACT: The World Health Organization (WHO) considers tuberculosis a reemerging disease and a major threat due to the increase in the number of notifications in humans, particularly in those with HIV/AIDS. Raw milk may harbor several pathogens, including *Mycobacterium bovis*, which causes tuberculosis in cattle and humans. In the state of Rio Grande do Norte (RN), the production chain of milk and derivatives constitutes a major economic and social activity, contributing to the generation of employment and income. The objective of this study was to perform molecular surveillance, using the nested-PCR system, to analyze the presence of *M. bovis* in 36 samples, 18 of which were raw milk and 18 were of artisanal coalho cheese, from farming industries in the state. The molecular surveillance did not detect *Mycobacterium bovis* DNA in the collected samples. This work is of relevance for this state, as it has never conducted an epidemiological survey to determine the prevalence of tuberculosis in cattle. It is important to alert the population about the risks associated with the consumption of unpasteurized milk and dairy products.

KEYWORDS: raw milk; coalho cheese; *Mycobacterium bovis*; safe food; One Health.

INTRODUÇÃO

A produção de laticínios tem aumentado rapidamente nos países em desenvolvimento, contribuindo de forma significativa para a saúde, nutrição, meio ambiente e subsistência das pessoas (GRACE; WU; HAVALAAR, 2020). Por outro lado, apesar dos benefícios, o leite cru pode abrigar vários patógenos incluindo o *Mycobacterium bovis*, causador da tuberculose em bovinos, bem como em humanos (DENEKE et al., 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a tuberculose uma doença reemergente e uma grande ameaça devido ao aumento do número de notificações em humanos, particularmente em pessoas vivendo com HIV/AIDS, bem como o aumento de isolados multirresistentes (BLOAÑOS et al., 2017). A enfermidade continua a afetar a saúde e a causar reduções substanciais na renda familiar, perda de bens, aumento da insegurança alimentar, interrupção da escolaridade das crianças e aumento das taxas de desemprego e pobreza (BRIER; LIA DWI JAYANTI, 2020).

A taxa da tuberculose zoonótica causada por *M. bovis* global é incerta, mas tem maior incidência em regiões onde há uma associação próxima entre pessoas e bovinos, e onde o leite e produtos lácteos são consumidos não pasteurizados (COLLINS; MORE, 2022). Apesar das limitações e do baixo número de trabalhos relacionados a tuberculose

zoonótica no mundo, um estudo retrospectivo de casos em San Diego nos EUA, de 1994 a 2005, mostrou que o *M. bovis* foi responsável por 45% dos casos de tuberculose em crianças e 6% dos casos de tuberculose em adultos (OLEA-POPELKA et al., 2017).

No Brasil, normas e legislações estabelecem critérios e procedimentos e aprovam Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade do leite cru e da elaboração de queijos artesanais. Apesar disso, a contaminação do leite com membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) foi documentada em vários estados e áreas geográficas do país (CARNEIRO et al., 2022). No estado de Pernambuco, por exemplo, foi detectada a presença do *M. bovis* em amostra de leite colhida diretamente de animais (CEZAR et al., 2016). Em consonância com esses achados, em estudo realizado no México, amostras de queijos frescos, tiveram amplificação na nested-PCR para bactérias MTC (LAURA PEREIRA-SUÁREZ et al., 2014).

No Rio Grande do Norte (RN), semiárido do Brasil, a cadeia produtiva de leite e derivados constitui uma atividade econômica e social de elevada importância, contribuindo para a geração de emprego e renda. Entretanto, percebe-se a ocorrência de alguns entraves para o fortalecimento das queijeiras artesanais, como a insuficiente e às vezes inadequada tecnologia de fabricação, estrutura física inadequada, mão de obra com baixa qualificação, ausência de controles gerenciais, deficiência de logística na comercialização, e a falta de registro junto aos órgãos de inspeção sanitária e ambiental (SEPLAN, 2016a).

Visando o fortalecimento da atividade e o acesso a mercados, foi firmado entre o Governo do RN e o Banco Mundial “O Projeto RN Sustentável”, o qual vem financiando Projetos de Iniciativas de Negócios Sustentáveis para organizações associativas da cadeia produtiva do leite e derivados da Agricultura Familiar, beneficiamento e inserção dos produtos no mercado, bem como, à adequação de agroindústrias (queijeiras) da agricultura familiar no Território Seridó (SEPLAN, 2016b). Este território é representado atualmente pela Região Geográfica Intermediária de Caicó, a qual produz 98,8 bilhões de litros de leite/ano, equivalente a 43,3% do leite do Estado (IBGE, 2017a).

Portanto, o objetivo deste estudo foi utilizar vigilância molecular, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como ferramenta para analisar a presença do principal causador da tuberculose em bovinos, o *Mycobacterium bovis*, em amostras de leite cru e queijos de coalho artesanal provenientes de agroindústrias em funcionamento beneficiadas pelo projeto no estado do Rio Grande do Norte.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do Estudo

O presente estudo foi realizado em 18 agroindústrias no estado do Rio Grande do Norte localizadas nos municípios de Caicó, Ceará Mirim, Currais Novos, Jardim do Seridó, Jucurutu, Parelhas, Riachuelo, São João do Sabugi, Tenente Laurentino Cruz e Umarizal (Figura 1).

Amostragem

Durante o mês de fevereiro de 2023, 36 amostras, sendo 18 de leite cru (30ml) e 18 de queijo de coalho artesanal (10g), foram coletadas em 18 agroindústrias no estado do Rio Grande do Norte. O leite foi coletado diretamente de tanques de resfriamento, enquanto, o queijo é oriundo da produção semanal. As amostras foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon, devidamente identificadas, congeladas e encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Diagnóstico Molecular no Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Câmpus de Patos-PB para pesquisa molecular. Durante a visita, os proprietários e/ou gerentes dos estabelecimentos foram entrevistados. O questionário tinha o objetivo de coletar informações relacionadas a localização, sexo, nível de escolaridade, características socioeconômicas, conhecimento sobre Boas Práticas de Produção e assistência recebida, bem como o destino da produção.

Análise Molecular

Extração de DNA

A extração do DNA total foi realizada utilizando o Kit DNEasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

PCR

Os DNAs extraídos das amostras de leite cru e queijo de coalho artesanal foram submetidos à PCR convencional Mb.400 conforme protocolo de SALES et al., 2014 que consiste na amplificação de um fragmento de DNA de 400 pares de bases (bp) e que flanqueiam a região de diferenciação 4 (*Região de Diferença 4 - RD4*), específica de *M. bovis*. Para a reação, foram utilizados os primers: Mb.400.F (5'AACGCGACGACCTCATATTC3') e Mb.400.R (5'AAGGCGAACAGATTCAGCAT3').

A termociclagem para PCR convencional seguiu conforme protocolo descrito por LIMA et al., 2021. Os produtos de PCR amplificados foram corados com Brometo de etídio e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com Tampão TBE 1X e observado em

fotodocumentador (Bio-Rad), sob luz ultravioleta. Para evitar contaminação do preparo do mix e da pipetagem do DNA, todo o processo ocorreu dentro de uma cabine específica para PCR. A concentração e a qualidade do DNA foram medidas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, por meio da análise molecular, não foi possível detectar DNA bacteriano do *Mycobacterium bovis* nas amostras de leite cru e queijos de coalho artesanal provenientes de agroindústrias no estado do Rio Grande do Norte (Figura 2).

A análise molecular, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem reduzido o tempo necessário para o diagnóstico de diversas doenças. Estudo realizado na Argentina forneceu evidência que a PCR pode ser utilizada de forma rápida e eficaz na identificação de *M. bovis* em suínos inspecionados rotineiramente em abatedouros. Sales et al., 2014 compararam diferentes primers para detecção de *M. bovis*, comprovando que os primers Mb.400, direcionados aos fragmentos que flanqueiam a região de diferenciação 4 (RD4), são os que demonstraram os melhores resultados na PCR para tuberculose bovina

Em pesquisa realizada em Baja California, México, onde é observada alta prevalência de tuberculose tanto em bovinos quanto em humanos, foi recuperado *M. bovis* através da cultura em 2,5% e a PCR direta detectou 6% de amostras de queijos contaminadas (ORTIZ et al., 2021). Por outro lado, pesquisa realizada no nordeste do Brasil, onde 35 amostras de queijos de coalho produzidos com leite cru foram cultivadas em meios específicos não apresentaram crescimento de bactérias do complexo *M. tuberculosis* (MEDEIROS et al., 2020). É importante destacar que a fase e o local da infecção a que o animal se encontra pode determinar a quantidade de bacilos no leite do animal (COLLINS; MORE, 2022).

Analisando os resultados obtidos, por meio da aplicação do questionário socioeconômico dos produtores, foi observado que a renda familiar dos entrevistados é variada. Pelo menos 61% (11/18) informaram ter remuneração na faixa de um a três salários-mínimos vigentes no período do estudo, onde dois declararam possuir renda inferior a um salário mínimo. A atividade de produzir queijos representava 50% da renda dessas famílias, de maneira que, para duas delas a atividade respondia por 100% da receita. A produção artesanal de queijos é importante no meio rural do Agreste e Sertão nordestino, ao dinamizar a economia em municípios de pequeno porte, constituindo em renda principal ou na complementação da renda das famílias, contribui para a circulação de renda no próprio município e desacelera o êxodo rural (MENEZES, 2011).

Em relação a sanidade dos rebanhos, no tocante a realização de testagem para brucelose e tuberculose animal, foi informado que 11 dos 18 entrevistados já haviam testado parte ou todos os animais de seus rebanhos. Destes, um já possuía a condição de rebanho com Certificação Livre para a brucelose e a tuberculose bovina. Conforme a Lei nº 13.860

de 2019, o qual dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais no Brasil, “A elaboração de queijos artesanais a partir de leite cru fica restrita a queijaria situada em estabelecimento rural certificado como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal, no prazo de até 3 (três) anos a partir da publicação desta Lei, sem prejuízo das demais obrigações previstas em legislação específica” (BRASIL, 2019).

De acordo com as informações coletadas, boa parte dos entrevistados 8/18 (44%) responderam ter cursado o ensino médio completo e 3/18 (16%) estão cursando o ensino superior. Sem dúvida, esse nível educacional possibilita haver avanços no conhecimento teórico sobre a atividade; segundo se constatou nas entrevistas o fato de todos eles terem participado de treinamento e/ou capacitação sobre produção segura de alimentos e Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Os agricultores também foram questionados se faziam parte de alguma associação ou cooperativa e se recebiam assistência técnica. Quase todos os participantes (94%), relataram estarem associados e 100% declararam receber assistência técnica. O Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae) em parceria com o Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (Senar) foram citados como os principais promovedores desse suporte técnico. A assistência técnica dada ao setor agropecuário e a participação em cooperativas ou entidades de classe aumentaram a eficiência no controle biológico das pragas em estudo sobre a produtividade da agricultura brasileira (RODRIGUES; FORTINI; C.R. NEVES, 2023).

No nosso estudo, 77% dos participantes eram do sexo masculino. Esta informação está em consonância com a realidade do Brasil onde 81% dos estabelecimentos rurais são administrados por produtores do sexo masculino (IBGE, 2017b). Em contraste com esse trabalho, pesquisa realizada em Malawi na África com o objetivo de avaliar o conhecimento geral dos produtores de leite sobre zoonoses, foi constatado que a maioria (60,0%) dos participantes da pesquisa eram mulheres (TEBUG et al., 2014). Em relação à renda familiar, observou-se que 61% (11/18) informaram ter remuneração na faixa de um a três salários-mínimos em vigor no período da entrevista. A atividade de produzir e vender queijos representava pelo menos cinquenta por cento da renda das famílias (11/18), de maneira que para duas delas a atividade respondia por 100% da receita da família.

Todos os estabelecimentos incluídos na nossa pesquisa eram produtores de queijo de coalho artesanal, porém somente três eram estabelecimentos exclusivos a esse produto. Observou-se que 66% deles eram produtores dos queijos de coalho e de manteiga. Um dado preocupante está relacionado ao baixo valor do queijo de coalho artesanal produzido e ao destino dessa produção. A grande maioria, 77% (14/18), declarou comercializar o seu produto por até R\$ 30,00 (trinta reais) para cada quilograma e uma pequena porção, 22%, consegue agregar um valor maior, variando de R\$ 30,00 a R\$ 60,00 (sessenta reais). Dos

18 entrevistados, 66% declararam comercializar seus produtos nos mercados municipais ou em feiras “livres”. É importante destacar que diversos municípios no nordeste do Brasil ainda estão com o Serviço de Inspeção de produtos de origem animal sendo estruturados, o que talvez seja um entrave para agregar valor e expandir os produtos.

Constatou-se que o soro do leite é destinado, na sua grande maioria (94%), para alimentação de animais na própria propriedade. Apenas um estabelecimento declarou utilizar o subproduto para os próprios animais e o restante é comercializado com agricultores da região. Estudo com o objetivo de avaliar a coprodução de β -galactosidase e etanol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 utilizando como fonte de carbono a lactose encontrada no soro de queijo de coalho descreveu o desenvolvimento de um processo biotecnológico viável e de valor agregado para coprodução de biomoléculas de interesse industrial (CARVALHO et al., 2020).

CONCLUSÃO

A vigilância molecular, através da PCR, não detectou DNA do *Mycobacterium bovis* nas amostras de leite cru e queijo de coalho artesanal coletadas. Este trabalho é de particular relevância para o estado do Rio Grande do Norte, pois o mesmo nunca realizou inquérito epidemiológica para determinar a prevalência da tuberculose em bovinos. É importante que a população seja alertada sobre os riscos associados ao consumo de leite e derivados lácteos não pasteurizados.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores de queijo de coalho artesanal do Rio Grande do Norte que aceitaram participar desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Araújo, CP, Osório, ALAR, Jorge, KSG, Ramos, CAN, Filho, AFS, Vidal, CES, Roxo, E., Nishibe, C., Almeida, NF, Júnior, AA F, Silva, MR, Neto, JDB, Cerqueira, VD, Zumárraga, MJ, Araújo FR., 2014. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. PLoS ONE, 9(3): 6. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091023>.

Bolaños, CAD, Lechinski de Paula, C., ST, Guerra, Franco, MMJ, Ribeiro, MG., 2017. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: An overview. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 59(40): 1–13. <https://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759040>.

Brasil, 2019. Lei Nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. www.agricultura.gov.br/Brasilwww.gov.br.

Brier, J.; Lia Dwi Jayanti, 2020. National surveys of costs faced by tuberculosis patients and their households 2015-2021, em: Reflections and future direction. Electronic Version, Nova York, pp. 53-56.

Carneiro, PAM, Pasquatti, TN, Lima, DAR, Rodrigues, RA, Takatani, H., Silva, CBDG, Jardim, R., Abramovitch, RB, Wilkins, MJ, Davila, AMR, Araujo, FR., 2022. Milk Contamination by Mycobacterium tuberculosis Complex, Implications for Public Health in Amazonas, Brazil. *Journal of Food Protection*, 85(11): 1667–1673. <https://dx.doi.org/10.4315/JFP-21-303>.

Carvalho, CT, Oliveira Júnior, SD, Lima, WBB, Medeiros, FGM, Leitão, ALOS, Santos, ES, Macedo, GR, Sousa Júnior, FC., 2020. Potential of “coalho” cheese whey as lactose source for β -galactosidase and ethanol co-production by *Kluyveromyces* spp. yeasts. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(9): 925–934. <https://dx.doi.org/10.1080/10826068.2020.1771731>.

Cezar, RDS, Lucena-Silva, N., Batista Filho, AFB, Borges, JM, Oliveita, PRF, Lúcio, EC, Arruda-Lima, M., Santana, VLA, Pinheiro Junior, JW., 2016. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 12(1): 4–9. <https://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0656-1>.

Collins, AB, More, SJ., 2022. Parameter estimates to support future risk assessment of *Mycobacterium bovis* in raw milk cheese. *Microbial Risk Analysis*, 21, 2352-3522. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mran.2022.100204>.

Deneke, TT, Bekele, A., Moore, HL, Mamo, T., Almaw, G., Mekonnen, GA, Mihret, A., Tschopp, R., Yeheyis, L., Hodge, C., Wood, JLN, Berg, S., 2022. Milk and meat consumption patterns and the potential risk of zoonotic disease transmission among urban and peri-urban dairy farmers in Ethiopia. *BMC Public Health*, 22(1): 1–17. <https://dx.doi.org/10.1186/s12889-022-12665-4>.

Grace, D., Wu, F., Havelaar, AH., 2020. MILK Symposium review: Foodborne diseases from milk and milk products in developing countries-Review of causes and health and economic implications. *Journal of Dairy Science*, 103(11): 9715–9729. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18323>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2017a. Censo Agropecuário 2017. Resultados definitivos. Recuperado em https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=24&tema=75657. Acesso em: 31 de maio de 2023.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2017b. Censo Agropecuário 2017. Resultados definitivos. Recuperado em https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/produtores.htm. Acesso em: 31 de maio de 2023.

Lima, DAR, Rodrigues, RA, Etges, RN, Araújo, FR., 2021. Bovine Tuberculosis in Safari Park in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 41(0): 69-73. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6719>.

Medeiros, GB, Rodrigues, OG, Bezerra Neto, PS, Medeiros, RS, Sarti, ECFB, Araújo, FR, Azevedo, SS, Higino, SSS., 2020. Detection of mycobacteria in coalho cheese sold in Northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(1): 439–446. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n1p439>.

Menezes, SSM., 2011 Queijo de Coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na Região Nordeste. *Revista de Geografia - UFPE*, 28 (1): 40–56. . <https://dx.doi.org/>

Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, AS, Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, BJ, Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglionone, M., Cosivi, O., LoBue, P., Fujiwara, PI., 2017. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *The Lancet Infectious Diseases*. 17(1): e21-e25. [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6).

Ortiz, AP, Perea, C., Davalos, E., Velázquez, EF, González, KS, Camacho, ES, Latorre, EAG, Lara, CS, Salazar, RM, Bravo, DM, Stuber, TP, Thacker, TC, Robbe-Austerman, S., 2021. Whole Genome Sequencing Links *Mycobacterium bovis* From Cattle, Cheese and Humans in Baja California, Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 8: 1–14. <https://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.674307>.

Pereira-Suarez, AL, Estrada-Chavez, Y., Zuniga-Estrada, A., Lopez-Rincon, G., Hernandez, DUM, Padilla-Ramirez, FJ, Estrada-Chavez, C., 2014. Detection of *mycobacterium tuberculosis* complex by PCR in fresh cheese from local markets in Hidalgo, Mexico. *Journal of Food Protection*, 77(5): 849–852. <https://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-389>.

Rodrigues, LCC, Fortini, RM, Neves, MCR., 2023. Impacts of the use of biological pest control on the technical efficiency of the Brazilian agricultural sector. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(1):1-16. <https://dx.doi.org/10.1007/s13762-022-04032-y>.

Sales, ML, Fonseca, AA, Sales, ÉB, Cottorelo, ACP, Issa, MA, Hodon, MA, Filho, PMS, Ramalho, AK, Silva, MR, Lage, AP, Heinemann, MB., 2014. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. *Folia Microbiol.* 59(5):433-438. <https://dx.doi.org/10.1007/s12223-014-0317-3>.

Secretaria de Estado do Planejamento e das Financias (SEPLAN), 2016a. Diagnóstico e Planejamento Estratégico para o Desenvolvimento de Atividades Produtivas Agrícolas do Rio Grande do Norte. Recuperado de <http://www.rnsustentavel.rn.gov.br>. Acesso em: 13 de Ago de 2022.

Secretaria de Estado do Planejamento e das Financias (SEPLAN), 2016b. Edital N° 005/2016 – PROJETO RN SUSTENTÁVEL. Chamada Pública a Projetos de Apoio a Cadeia Produtiva do Leite e Derivados da Agricultura Familiar. Recuperado de <http://www.rnsustentavel.rn.gov.br>. Acesso em: 09 de Fev de 2023.

Tebug, SF, Njunga, GR, Chagunda, MGG, Mapemba, JP, Awah-Ndukum, J., Wiedemann, S., 2014. Risk, knowledge and preventive measures of smallholder dairy farmers in northern Malawi with regard to zoonotic brucellosis and bovine tuberculosis. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 8(1): 1-6. <https://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v8i1i.594>.

FIGURAS

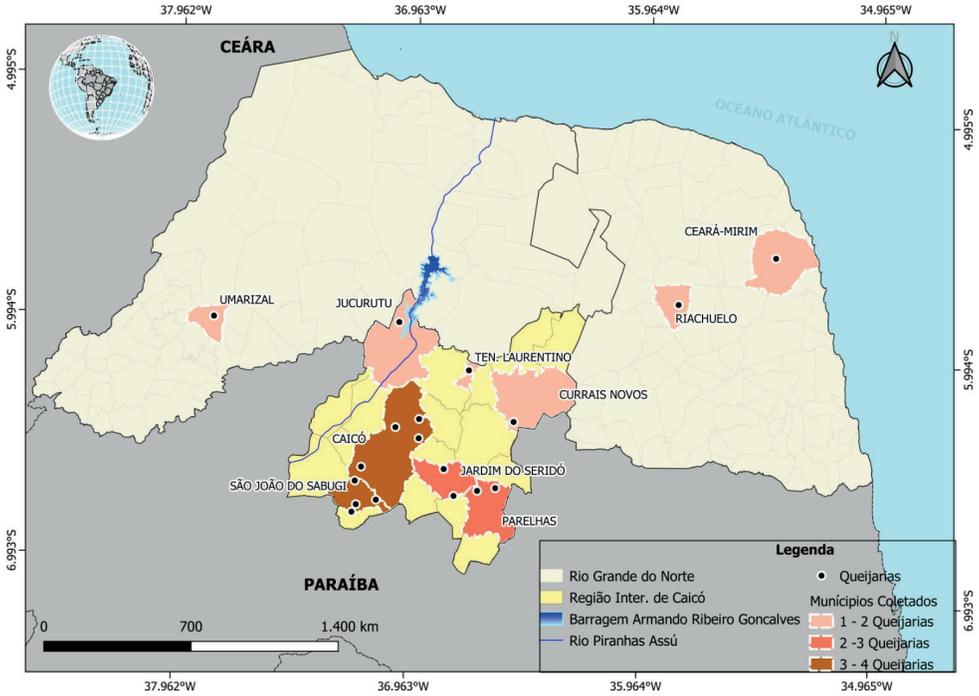


Figura 1: Agroindústrias produtoras de queijos artesanais no estado do Rio Grande do Norte, Brasil (2023).





Figura 2: Amplificação por PCR visando a região de diferenciação 4 do *Mycobacterium bovis* (C+ = controle positivo, LRN/QRN (1-9/11-19) = amostras), em amostras de leite cru e queijo de coalho de agroindústrias do Rio Grande do Norte. Marcador molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).